

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences Exactes
Département de Chimie

N° d'ordre :

Série :

Thèse présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Science
En Pharmacochimie Option : Chimie pharmaceutique

Thème :

Contribution à l'étude de la composition chimique
et des Propriétés biologiques de la propolis

Présentée par :

Segueni Narimane

Sous la direction du Professeur :

Rhouati Salah

Soutenu le 29/05/2011

Devant le jury composé de :

Président : Mr Debbache Abd Elmagid Professeur à l'Université Mentouri de Constantine

Rapporteur : Mr Rhouati Salah Professeur à l'Université Mentouri de Constantine

Examineur : Mr Lahouel Mesbah Professeur à l'Université de Jijel

Examineur : Mr Hornebeck William Professeur à l'Université de Reims.

Examineur : Mr Benkiniour Rachid Maître de conférence à l'Université de Constantine

Examineur : Mr Zellagui Amar Maître de conférence à l'Université d'Oum Bouaghi

Dédicace :

Je dédie ce travail à tous ceux que j'aime et que j'estime en particulier :

✚ *A mes parents qui m'ont toujours soutenue avec beaucoup d'amour.*

✚ *A mes sœurs Rihef Haifa et Abir, pour leur amour, leur patience et leur soutien éternel.*

✚ *A mon frère mérrouane, pour son amour.*

✚ *A la mémoire de mes grands parents.*

✚ *A mes cousins et cousines, mes tantes et mes oncles.*

✚ *A tous mes amis.*

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Rhouati Salah pour sa disponibilité, ses conseils et son suivi tout au long de mes années de recherche qui ont permis de mener à terme ce travail. Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur Debbache. AM, Professeur à l'université de Constantine, pour l'honneur et le plaisir qu'il me fait en acceptant la présidence du jury de ma thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Hornebeck. W pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour ses conseils, son encadrement scientifique et sa disponibilité durant mes nombreux stages. Je le remercie pour avoir accepté de juger ce travail malgré ses nombreuses responsabilités.

A monsieur Lahouel. M. La pharmacologie était un domaine passionnant pour moi. J'ai appris auprès de vous à l'aimer. J'ai découvert avec vous la propolis sujet de mon magister. Depuis, c'est avec plaisir et beaucoup de curiosité scientifique que je poursuis mes recherches sur ce produit très intéressant. Vous avez accepté de faire partie de mon jury. Pour tout cela je vous remercie.

A monsieur Benkiniour. R . En travaillant à vos cotés, j'ai pu apprécier votre gentillesse et votre disponibilité. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'exprime ma sincère reconnaissance à monsieur Zellagui. A. Pour son soutien et pour le temps qu'il a pu consacrer pour m'aider. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier madame le professeur Catherine Lavaud et monsieur Abdul Magid Abdulmagid du laboratoire de pharmacognosie de l'université de Reims Champagne Ardenne pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et

précieux conseils ainsi que leur contribution à la séparation et à l'élucidation structurale des composés isolés.

J'exprime ma sincère reconnaissance à monsieur le professeur Frank Antonicelli du laboratoire de biochimie médicale et biologie moléculaire de l'université de Reims. Pour sa disponibilité et son aide surtout pour les tests concernant les souches cellulaires.

A Martine Demarme qui je ne remercierai jamais assez pour son aide et sa patience envers une jeune débutante. Pour son enthousiasme et ses compétences techniques. J'ai pu profiter de sa grande expérience et découvrir les MMPs dans la bonne humeur. Elle a su me reconforter et me soutenir quand le moral était au plus bas. Je lui assure ma sincère reconnaissance.

A madame Smatti . F pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

A monsieur Benlabed. K pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide concernant la partie bactériologie.

A monsieur Benkhaled. M pour sa précieuse aide.

Merci à tous les membres du laboratoire de produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique avec qui j'ai partagé paillasse, matériel, conseil et discussion et qui m'ont aidé à comprendre le monde de la phytochimie et à l'apprécier.

Je remercie tout le personnel du laboratoire de bactériologie du centre hospitalo-universitaire de Constantine Ibn Badis et le laboratoire de biochimie médicale et biologie moléculaire de l'université de Reims, qui ont contribué chacun pour sa part à la réalisation de cette thèse.

Un grand merci s'adresse à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à mener à bien ce travail.

Sommaire :

Abréviations.....	I
Liste des illustrations.....	III
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	VIII
Introduction générale.....	1
Références.....	5

Chapitre I : Propolis

I-1-Introduction.....	8
I-2-Origine botanique.....	10
I-2-1-Propolis des zones tempérées.....	10
I-2-2- Propolis des zones tropicales.....	11
I-3-Récolte.....	11
I-3-1-Par les abeilles.....	11
I-3-2-Par l'homme au niveau de la ruche.....	12
I-4-Aspects macroscopiques et microscopiques.....	14
I-5-Composition chimique.....	15
I-5-1-Composition chimique de la propolis des zones tempérées.....	15
I-5-2-Composition chimique de la propolis des zones tropicales.....	16
I-6-Propriétés thérapeutiques.....	16
I-7-Toxicité.....	17
I-8-Conservation.....	18
Références.....	19

Chapitre II : Métalloprotéinases matricielles

II-1-Introduction.....	25
II-2-Classification.....	25
II-3-Structure.....	27
II-4-La stromelysine-1 (MMP-3).....	29
II-5-Activation des MMPs.....	29
II-6-Régulation de l'activité des MMPs.....	31
II-7-Le système plasminogène/ plasmine.....	32
II-8-Les activateurs du plaminogène.....	34
II-9-Système plasminogène/ plasmine et surface cellulaire.....	34
II-10-Contrôle de l'activité du système Plg/ Pm.....	35
II-11- Les cascades protéolytique.....	36
II-12-Peau et vieillissement.....	38
II-12-1-Structure de la peau.....	38
II-12-2-Matrice extracellulaire.....	41
II-12-3-Vieillessement cutané.....	43
II-12-3-1-Vieillessement intrinsèque.....	43
II-12-3-2-Vieillessement extrinsèque.....	44
Références.....	46

Chapitre III : Flavonoïdes

III-1-Introduction.....	52
III-2-Composition chimique et localisation.....	52
III-3-Les flavonoïdes communs.....	54
III-3-a-Les aglycone.....	55
III-3-b-Les hétérosides.....	55

III-3-1-Les flavonoïdes-O-substitués.....	55
III-3-1-a-L'hydroxylation.....	55
III-3-1-b-la-O-méthylation.....	55
III-3-1-c-La-O-glycosylation.....	56
III-3-2-Les flavonoïdes –C-substitués.....	57
III-3-2-a-La-C-méthylation.....	57
III-3-2-b-La-C-glycosylation.....	57
III-4-Biosynthèse des flavonoïdes.....	57
III-5-Distribution et localisation.....	60
III-6-Intérêt des flavonoïdes.....	60
III-6-1-Intérêts biologiques.....	60
III-6-2-Intérêts pharmacologiques.....	61
III-7-Méthode d'étude structurale des flavonoïdes.....	63
III-7-1-Spectrométrie UV-visible.....	63
III-7-2-La spectrométrie de masse.....	67
III-7-3-Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.....	70
Références.....	74

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV-1-Etude comparative de quelques propolis de l'Est algérien.....	78
IV-1-1-Etude de l'activité antibactérienne.....	78
IV-1-1-1-Extraction.....	78
IV-1-1-2-Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé.....	79
a-Préparation des disques.....	79
b-Réalisation de l'antibiogramme.....	79
IV-1-1-3-Détermination des CMI.....	80
IV-1-2-Etude du profil chimique.....	83
IV-1-3-Extraction et analyse des huiles essentielles.....	85
IV-1-3-1-Extraction.....	85
IV-1-3-2-Analyse GC-MS.....	85
IV-2-Etude de la propolis de Benibelaid.....	86
IV-2-1-Etude de l'activité cicatrisante.....	86
IV-2-1-1-Extraction.....	86
IV-2-1-2-Méthode.....	86
IV-2-1-2-a-Préparations testées.....	86
IV-2-1-2-b-Entretien des animaux.....	87
IV-2-1-2-c-Traitement des animaux.....	87
IV-2-1-2-d-Analyse statistique.....	89
IV-2-2-Etude Phytochimique.....	89
IV-2-2-1-Extraction.....	89
IV-2-3-Méthode de séparation et de purification.....	91
IV-2-3-1-Séparation des composants de l'extrait acétate d'éthyle.....	91
IV-2-3-2-séparation et purification des composants de l'extrait 1/1.....	95
IV-3-Fractionnement bioguidé de principes inhibiteurs des métallo protéinases matricielles.....	101
IV-3-1-Fractionnement bioguidé de la phase butanolique.....	101
IV-3-2-Evaluation de l'activité inhibitrice de la propolis.....	105
IV-3-2-1-Evaluation enzymologique.....	105
IV-3-2-2-Mise au point de la mesure de l'effet inhibiteur des propolis sur l'activité enzymatique des MMPs à l'aide d'un spectrofluorimètre lecteur de plaque.....	106

IV-3-3-Influence de la propolis sur l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine par les fibroblastes du derme humains en culture.....	109
IV-3-3-1-En absence d'UV-A.....	109
IV-3-3-1-1-Activation de la pro-MMP-3 par la plasmine.....	109
IV-3-3-1-2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium.....	111
IV-3-3-2-En présence d'UV-A.....	112
IV-3-3-3-En présence de kappa-élastine.....	114
Références.....	116

Chapitre V : Résultats et discussion

V-1-Etude comparative de quelques propolis de l'Est algérien.....	121
V-1-1-Etude de l'activité antibactérienne.....	121
V-1-1-1-Résistance des souches testées.....	121
V-1-1-2-Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé.....	121
V-1-1-3-Détermination des CMI.....	128
V-1-1-4-Etude du profil chimique.....	130
V-1-1-4-a-Spectre d'absorption UV-visible.....	130
V-1-1-4-b-Profil chimique.....	131
V-1-2-Extraction et analyse des huiles essentielles.....	138
V-2-Etude de la propolis P2.....	142
V-2-1-Etude de l'activité cicatrisante.....	142
V-2-1-a-Variation du poids.....	142
V-2-1-b-Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies des rats témoins (1) et traités (3).....	143
V-2-1-c-Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies des rats témoins (1) et traités (4).....	146
V-2-1-d-Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies des rats témoins (2) et traités (3).....	148
V-2-2-Etude phytochimique.....	150
V-2-2-1-Identification des produits de l'extrait acétate d'éthyle.....	150
V-2-2-1-1-Elucidation structurale du composé F ₁₃₋₁	150
V-2-2-1-2-Elucidation structurale du composé F ₁₃₋₂	155
V-2-2-1-3-Elucidation structurale du composé F _{a-P1}	161
V-2-2-1-4-Elucidation structurale du composé F _{e-1}	167
V-2-2-1-5-Elucidation structurale du composé SC1-F6-9.....	171
V-2-3-Identification des composés de l'extrait 1/1.....	173
V-2-3-1-Elucidation structurale du composé F ₁₃	173
V-2-3-2-Elucidation structurale du composé F ₁₄	188
V-2-3-3-Elucidation structurale du composé F ₁₅	196
V-2-3-4-Elucidation structurale du composé F ₁₉₋₂₄	204
V-2-3-5-Elucidation structurale du composé C-f55-57.....	210
V-2-3-1-Elucidation structurale du composé C-f65.....	215
V-3-Fractionnement bioguidé de principes inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles.....	219
V-3-1-Identification des produits de l'extrait butanolique.....	219
V-3-1-1-Elucidation structurale du composé B ₃₋₄	219
V-3-1-2-Elucidation structurale du composé B ₃₋₈	227
V-3-1-3-Elucidation structurale du composé B ₃₋₁₀	237
V-3-1-4-Elucidation structurale du composé B ₃₋₁₂	243
V-3-1-5-Elucidation structurale du composé B ₃₋₁₅	254

V-3-2-Evaluation de l'activité inhibitrice de la propolis.....	264
V-3-2-1-Effet inhibiteur de la propolis sur l'activité enzymatique des MMPs.....	264
V-3-2-2-Effet de la propolis sur l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine.....	269
V-3-2-2-1-In vitro.....	269
V-3-2-2-2- Ex vivo.....	271
V-3-3-Influence de la propolis sur l'expression de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture.....	271
V-3-3-1-En absence d'UV-A.....	271
V-3-3-2-En présence d'UV-A.....	272
V-3-3-3-En présence de kappa-élastine.....	275
Références.....	281
<i>Conclusion</i>	288
<i>Références</i>	291
VI-Annexes.....	292
VI-I-Volatils constituents of algerian propolis.....	293
VI-II-Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from propolis sample from Algeria.....	299

Introduction Générale

La santé et la beauté font parties des préoccupations de l'homme qui continu toujours de chercher le meilleur moyen de les entretenir. Ses recherches ont connu un changement considérable ces dernières années. Plusieurs industriels tels que les firmes pharmaceutiques et l'industrie du cosmétique ont suivi une nouvelle révolution : le retour à la nature. Ainsi, la médecine douce propose des traitements plus doux, moins agressifs et surtout plus acceptés par le malade et la cosmétologie propose des préparations à base de produits naturels plus appréciées et plus recherchées par le consommateur.

L'apithérapie est l'une des méthodes de soin naturelle. Elle est basée sur les produits de la ruche tel que : le miel, la gelée royale, la propolis ...etc. Les premières traces de cette science remontent à l'Egypte antique. Cette pratique millénaire est mentionnée dans de nombreux écrits. On retrouve les traces d'utilisation du miel qui fut l'ingrédient le plus utilisé dans les remèdes, tant en usage externe ou interne pour les blessures et les brûlures. Des recherches plus poussées ont permis aux égyptologues de découvrir les traces d'utilisation d'un autre produit apicole : la propolis. Cette substance était utilisée par les grands prêtres de l'ancienne Egypte pour les embaumements des momies (De Almeida et Menezes 2002). La propolis était également connue des anciens grecs d'où sa dénomination (d'origine Grecque) qui signifie pro : devant et polis : cité, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche. Les anciens grecs l'ont utilisée pour les suppurations. Les romains quant à eux, l'ont donnée à tous les soldats pour soigner les blessures pendant leurs différentes invasions. Cette substance est souvent mentionnée, à côté d'autres produits de la ruche dans les traités de Géorgie à partir du XII siècle. Avicenne l'a mentionne aussi dans son livre « Le canon de la science médicale » et décrit une utilisation thérapeutique de ce produit.

Connu des Incas chez lesquels elle était utilisée dans le cadre des infections fébriles. Ce n'est qu'aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles qu'on retrouve quelques traces de son usage dans le traitement des plaies. Mais c'est à l'occasion de la guerre des Boers en Afrique du sud qu'elle connaît son apogée d'utilisation (Hegazi 1997, Lavie 1975).

La propolis est donc utilisée en médecine populaire depuis les temps les plus reculés. Son utilisation sans avoir été permanente s'est poursuivie au fil des années jusqu'à ce qu'elle soit redécouverte de façon relativement récente. Ces dernières années de nombreux travaux se sont intéressés à la composition chimique et aux effets biologiques de cette substance. Ces travaux ont montré que cette substance est composée essentiellement de flavonoides. Cette composition varie en fonction de son origine, de l'espèce d'abeille et du temps de la récolte. On lui reconnaît de nombreuses propriétés : antibactérienne (Ghisalberti 1979, Velikova et al

2000), antivirale (Dimov *et al* 1991, Murad *et al* 2002), anti-inflammatoire (Miyataka *et al* 1997), anti-oxydante, anticancéreuse (Burdock 1998)etc. Son efficacité une fois prouvée lui a valu un intérêt particulier par l'ensemble des chimistes, biochimistes, pharmacologues.... qui essaie d'identifier de nouveaux principes actifs susceptibles d'être utilisés en thérapeutique.

L'ensemble de ces données nous a encouragés à étudier la composition chimique et les propriétés biologiques de la propolis algérienne. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à plusieurs propolis de l'Est Algérien. Une étude comparative en fonction de leur profil chimique, composition en huiles essentielles et activité antibactérienne est réalisée. Cette première partie nous a permis de choisir une propolis sur laquelle nous avons réalisé une étude plus approfondie. Nous nous sommes intéressés à l'effet cicatrisant de cette propolis. Cette activité est étudiée en complément de l'activité antibactérienne pour expliquer l'efficacité rapportée de l'utilisation de la propolis en médecine traditionnelle dans le traitement des plaies infectées. Nos tests ce sont concentrés sur la comparaison de l'effet local de certaines préparations à base de propolis. Le phénomène de cicatrisation est apprécié en fonction de la réduction de la surface des plaies par rapport au contrôle (témoin) ainsi que l'observation macroscopique de certains paramètres tel que l'apparition de bourgeons et l'apparition et la disparition de la rougeur et de l'œdème ...etc.

Dans la deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la propolis algérienne. Nos recherches bibliographiques ont montré qu'aucune étude phytochimique n'a été réalisée sur la propolis algérienne jusqu'à présent. De nombreux travaux ce sont intéressés à la composition chimique de la propolis. Ces travaux ont montré que cette composition dépend de l'origine botanique de cette résine. Les propolis des zones tempérées sont composées essentiellement de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les dérivés de l'acide cinnamique (Marcucci 1995). En plus de ces composés, les propolis des zones tropicales sont riches en diterpènes, lignanes et quelques composés prénylés (prenylated compounds). Ces propolis semblent différentes, elles n'ont restent pas moins actives l'une que l'autre. L'Algérie de part sa richesse en régions boisées et la richesse de son sol en plantes endémiques est susceptible de fournir des propolis différentes de celles des autres zones tempérées surtout du point de vue chimique. Cette hypothèse, nous a encouragés à réaliser une investigation phytochimique de quelques propolis de l'Est Algérien. Notre travail s'est porté sur les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes auxquels sont attribués de nombreuses activités biologiques de la propolis comme l'activité antibactérienne, antioxydante....etc. Ces composés sont recherchés et séparés par les différentes techniques

chromatographiques. L'identification et la détermination de la structure de ces composés est réalisée par les différentes techniques spectroscopiques telle que la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire (H^1 et C^{13}) mono et bidimensionnelle ainsi que la spectrométrie UV-visible.

Les polyphénols sont des produits naturels biologiquement actifs. Ces molécules sont de puissants antioxydants capables de piéger les radicaux libres (Dugas *et al* 2000). De nombreux travaux se sont intéressés à l'effet préventif de ces métabolites sur le vieillissement photo-induit et plusieurs équipes de recherches les considèrent comme de puissant agent contre ce type de vieillissement. Cette activité serait étroitement liée à leur pouvoir antioxydant (Offord *et al* 2002, Jeminez *et al* 2006).

Au cour du vieillissement photo-induit, les UV provoquent un stress oxydatif par une surproduction des radicaux libres oxygénés (ROS) dans toute les cellules cutanées et au niveau de la matrice extracellulaire. Cette surproduction entraine l'augmentation de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire dermique : les métalloprotéinases matricielles, expliquant les anomalies morphologiques du collagène et des fibres élastiques (Ramos Desimone *et al* 1999, Brennelsen *et al* 2002). Le vieillissement photo-induit constitue donc l'un des axes de recherche les plus actifs en dermatologie et en cosmétologie.

Lors du vieillissement, il existe un déséquilibre de la balance entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire par les métallopréinases. On observe *in vivo* dans les cellules sénescents ou photo-irradiées accumulées dans le derme une augmentation de la synthèse de certaines métalloprotéinases mais également une diminution des inhibiteurs endogènes de ces enzymes les TIMPs (Fischer *et al* 2009). Ce déséquilibre entre MMPs et inhibiteurs entraine l'excès de dégradation de la matrice caractéristique du vieillissement cutané. Pour rétablir cet équilibre, le contrôle de l'activité des métalloprotéinases peut s'effectuer à différents niveaux : la transcription des gènes codant ces enzymes, la stabilité des ARN messagers correspondants, leur traduction, l'activation du précurseur de l'enzyme (proenzyme), son inhibition ou son endocytose (Hornebeck *et Maquart* 2003).

La dermatocosmétique a développé très peu d'inhibiteurs chimiques des métalloprotéinases. L'approche cosmétologique se veut principalement naturelle et les inhibiteurs utilisés proviennent majoritairement de sources naturelles (Maquart *et al* 1999). La lutte anti-âge de ces dernières années s'est principalement focalisée sur les effets anti-radicaux libres. Cette approche de la lutte contre le vieillissement cutané vise à diminuer les

processus liés à la surproduction des radicaux libres oxygénés tel que la surexpression des métalloprotéinases (Cauchard et Hornebeck 2004).

De nombreux travaux se sont intéressés à l'activité antioxydante de la propolis. Cette activité serait à l'origine de beaucoup d'autres effets tels que l'action antitumorale, hépato et cardioprotectrice (Burdock 1998, Marcucci *et al* 2001). Une étude plus récente de la propolis a permis d'isoler et d'identifier un phenethyl ester de l'acide caféique (CAPE). Ce composé est un puissant inhibiteur des MMP-2 et MMP-9. Cependant, il n'a aucune action sur les MMP-1 et MMP-3 (Chung *et al* 2004). Dans la dernière partie de notre travail nous nous sommes intéressés à l'effet anti-âge de la propolis et ses polyphenols ainsi qu'à leurs actions sur l'expression et l'activation de la MMP-3, enzyme clé dans l'activation des pro-MMP-1 et pro-MMP-9 via le système plasminogène / plasmine dans les conditions normales et après stimulation de sa surproduction par les irradiations UV (UV-A) et les peptides d'élastines (kappa-élastine).

Références :

- Brennensen, P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K (2002). UV-B irradiation and matrix metalloproteinases : from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad* **973**, 31-43.
- Burdock, GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* **36**, 347-363.
- Cauchard, J. H., Hornebeck, W (2004). Vieillesse les enzymes gloutonnes de la peau. *Vivant 5: Vieillesse, peau et métalloprotéinases* 01/10/04.
- Chung, T. W., Moon, S. K., Chang, Y. C., Ko, J. H., Lee, Y. C., Cho, G., Kim, S. H., Kim, J. K., Kim, C. H (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* **18**, 1670-1681.
- De Almeida, E. C., Menezes, H (2002). Anti-inflammatory activity of propolis extract: A review. *J of Venomous Animal and Toxins* **8**, 191-212.
- Dimov, V., Ivanoska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nicolov, N., Popov, S (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. *Apidologie* **22**, 155-162.
- Dugas, Jr . A. J., Casteneda-Acosta, J., Bonin, G. C., Price, K. I., Fischer, N. H., Winston, G. W (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod* **63**, 327-331.
- Fisher, G. J., Quan, T., Purohit, Y., Cho, M.K., He, T., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J. J (2009). Collagen fragmentation promotes oxydatif stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged skin. *Am J pathol* **174**, 101-114.
- Ghisalberti, E. L (1979). Propolis a review. *Bee Wold* **60**, 59-84.
- Hegazi, A. G (1997). Propolis an overview. *International Symposium on Apitherapy Cairo 8 and 9th Egypt*.
- Hornebeck, W., Maquart, F. X (2003). Proteolysed matrix as a template for the regulation of tumor progression. *Biomed Pharmacother* **57 (5-6)**, 223-30.
- Lavie, P (1975). *La propolis*. Edition: Apimondia. Bucharest.
- Maquart, F. X, Simeon, A., Pasco, S., Monboisse, J. C (1999). Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracellulaire: le concept de matrikine. *J Soc Biol* **193**, 423-28.
- Marcucci, M. C (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83-99.

- Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., Valenter, P. H., Paulina, N (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacology* **74**, 105-112
- Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Sotah, T (1997). Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* **20**, 497-501.
- Murad, J. M., Calvi, S. A., Soares, M. V., Bankova, V., Sforcin, J. M (2002). Effect of propolis from Brazil and Bulgaria on fungucidal activity of macrophage against *Paracoccidivides Brasiliensis*. *J Ethnopharm* **79**, 331-334.
- Offord, E. A., Gautier, J. C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Kramet, K., Applegate, L. A (2002). Photo-protective potential of lycopene , β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UV-A irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biol Med* **32**, 1293-1303.
- Ramos-De Simone, N., Hahn-Danton, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L., Quingley, J (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* **274**, 13066-13076.
- Velikova, M., Bonkova, V., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A (2000). Chemical composition and biological acivity of propolis from Brazilian Meliponinae. *Z Naturforsch* **55 (9-10)**, 785-9.

Chapitre-I :

La propolis

I-1-Introduction :

La propolis est une substance résineuse et gommeuse de consistance visqueuse, recueillie par les abeilles sur certaines parties (bourgeons et écorces essentiellement) de végétaux (certains arbres principalement) (Challem 1995, Ghisalberti 1979, Kujumgiev et *al* 1999, Park et *al* 1999).

Plusieurs recherches ont montré que la propolis pouvait avoir deux origines : interne, issue de la première phase de digestion du pollen (Hegazi 1997) ou externe, collectée par les abeilles de différentes plantes. Ces dernières la rapportent à la ruche, et la modifient en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) (Valcic et *al* 1999). Cependant, la théorie de l'élaboration interne de la propolis (qui serait issue de la première phase de digestion du pollen), régurgitée ensuite par l'abeille, semble, d'après les dernières observations effectuées en la matière, ne plus pouvoir être retenue.

La propolis est utilisée comme biocide par les abeilles, elle est responsable de la faible incidence des bactéries et moisissures à l'intérieur de la ruche (Challem 1995, Ghisalberti 1979, Valcic et *al* 1999). Les abeilles l'utilisent pour enduire l'entrée et les cadres de la ruche pour empêcher l'entrée de courant d'air à l'intérieur de la ruche. Elle est utilisée aussi pour embaumer (momifier) les ennemis tués s'ils sont trop volumineux pour être évacués par les abeilles hors de la ruche (Challem 1995, Ghisalberti 1979, Lavie 1975).

C'est ainsi que les violons de stradivarius ont été induits pour donner un meilleur son et pour les protéger contre le ver de bois (Burdock 1998).

Beaucoup moins anciennement connue que le miel, la propolis remonte vraisemblablement à l'Égypte antique (De Almeida et Menezes 2002) et de façon certaine aux grecs (propolis provient du grec : pro, qui signifie : en avant, et de polis : la cité ; l'entrée de la ruche). Aristote en parle dans son livre « l'histoire des animaux » et la considère comme un remède aux affections de la peau, des plaies et des suppurations.

Au cours du premier siècle avant J-C, le célèbre savant latin Varron en fait état dans ses travaux. Le poète Virgile, dans ses écrits en fait de même. Au tout début de notre millénaire, les romains Pline et Dioscoride entretiennent une polémique quant à son origine, le premier écrivait par ailleurs à son sujet : « elle retire les aiguillons et ce qui est entré dans la chair, elle réduit les enflures et ramollit les durcissements de la peau. Elle diminue les douleurs nerveuses, guérit les ulcères, abcès, furoncle souvent incurables ».

Au 2^{ème} siècle après J-C, c'est au tour du médecin Galien d'en faire mention dans ses traités avant le philosophe médecin iranien Avicenne qui, au 11^{ème} siècle, note à son propos : « a la qualité de faire éliminer les pointes des flèches et les épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement ».

Connue des Incas chez lesquels elle était utilisée dans le cadre des infections fébriles, la propolis est retrouvée également dans les livres de médecine de Géorgie, à partir du 12^{ème} siècle, où elle entre dans la préparation de nombreux remèdes.

En France, on trouve quelques traces de son usage aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles dans le traitement des plaies. Mais c'est surtout à l'occasion de la guerre des Boers en Afrique du Sud qu'elle connaît son apogée d'utilisation (Lavie 1975, Hegazi 1997).



Photo-1 : Ruche d'abeille.

I-2-Origine botanique :

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'origine botanique de la propolis, en se basant sur leurs observations et dans certains cas en se référant à des connaissances chimiques faibles qui comportent des comparaisons entre échantillons de propolis et matériel végétal.

Valcic et *al* 1999 ont étudié la propolis du Chili, pour déterminer son origine botanique par des analyses microscopiques du pollen et des fragments de feuilles trouvés dans la propolis.

Francisco A Tomas-Barberan et *al* 1993 ont observé les abeilles dans leurs vols puis récolté les fleurs visitées. Ces fleurs ainsi que différentes propolis sont extraites par le méthanol, puis analysées par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) pour déterminer le profil des composés phénoliques. Une fois déterminés, les profils sont comparés. Les chromatogrammes identiques ou similaires permettent de déterminer la source de la propolis.

Selon Crane 1988 les plantes et les arbres sécrètent une substance résineuse et gommeuse pour se protéger des insectes, des bactéries et des moisissures lorsqu'elles sont blessées. Après plusieurs études, Crane a établi une liste de plantes suspectées d'être la source de la propolis. La collecte de la propolis est une activité rare des abeilles, difficile à observer. Elle se fait souvent au niveau des arbres (Bankova et *al* 2000). C'est pour cette raison que nous ne discuterons que les résultats des études de comparaisons chimiques entre la propolis et les plantes pour les deux zones : tempérée et tropicale.

I-2-1-Propolis des zones tempérées :

Plusieurs études ont démontré que dans les zones tempérées : en Europe, Afrique du Nord, Asie et en Amérique du Nord, la source principale de la propolis est le peuplier (*populus. sp*) avec toutes ses espèces (Francisco A Tomas-Barberan et *al* 1993). Les espèces utilisées sont comme suit :

- Europe : *Populus nigra* (Maciejewicz et *al* 2001).
- Bulgarie : *Populus nigra*, *Populus nigra italia*, *P.trenula* (Bankova et *al* 1992 et 1994, Marcucci MC 1995).
- Albanie : *Populus nigra* (Bankova 1994).
- Mongolie : *P. suaveolens* (Bankova et *al* 1994, Marcucci 1995).
- USA : *Populus fremontii* (Greenway et *al* 1990).

La propolis peut avoir aussi comme origines : prunier, frêne , chêne , orme (Lavie 1975), aulne (Francisco A Tomas-Barberan et al 1993, Lavie 1975, Makashvili 1978), bouleau , féverole et saule (Hegazi 1997), ainsi que des conifères : pin , sapin et épicéa (Hegazi 1997, Lavie 1975, Metzner et al 1997).

I-2-2-Propolis des zones tropicales :

Dans les zones tropicales où le peuplier est inexistant, les abeilles cherchent une autre source de propolis. Chaque région et chaque colonie à une plante préférée.

- Au Brésil la propolis a comme source principale *Baccharis dracunculifolia* DC (Lopez et al 2003). Elle peut provenir aussi d'autres espèces comme : aroucacia, vernomia, diclenia, hyptis (Santos et al 2003) et eucalyptus (Lopez et al 2003).
- Au Venezuela, les exsudats des deux espèces *Clusia major* et *Clusia minor* sont la source principale de la propolis (Valcic et al 1999).
- En Australie, les abeilles utilisent *Xanthorrhoea pressii* Endl et *X. australis*.
- A Hawaii, les espèces utilisées sont : *Plumeria accuminata* AIT, *P. rubra acutifolia*, *Schinus terebinthifolius* et *Psidium guajava* (Francisco A Tomas-Barberan et al 1993).

La connaissance de la source végétale de la propolis est très importante pour sa standardisation chimique. La propolis est ainsi facilement caractérisée.

I-3-Récolte:

I-3-1-Par les abeilles :

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses (qui sont dans la dernière partie de leurs existences). Ces ouvrières sont très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie (la récolte du nectar par exemple) et cela même si la demande s'en fait sentir. Leur travail se limite au colmatage de l'intérieur de la ruche.

La récolte qui ne répond pas à des règles bien définies et constantes, dépend de nombreux facteurs :

- Facteurs saisonniers : la récolte a lieu, selon les cas, soit en début de saison (c'est à dire au printemps) soit le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne (au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage). De plus il faut noter, que c'est au moment où la miellée de nectar est la plus abondante, que la récolte de la propolis est la moins importante, les abeilles semblent alors y consacrer moins de temps et moins d'efforts (Lavie 1975).

- Facteurs géographiques : il a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées propolisent plus que les ruches de plaines (Hegazi 1997).
- Facteurs climatiques (la température): les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires.
- Facteurs liés à la race d'abeille: il est reconnu que les caucasiennes et certaines autres races d'Asie mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) propolisent, en général, davantage que les autres. Dans de nombreux autres cas, les données concernant ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises.

Cette récolte s'effectue schématiquement de la façon suivante :

- La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source. Ensuite elle l'attaque avec ses mandibules, enfin elle détache la particule saisie,
- Elle l'entasse dans l'une des corbeilles de ses pattes postérieures (3^{ème} paire) à l'aide de ses autres pattes pour accumuler ainsi progressivement une pelote (qui est en général un peu plus petite qu'une pelote de pollen) qu'elle rapportera à la ruche.

Au retour à la ruche, la butineuse de propolis est déchargée de sa récolte par d'autres ouvrières, le plus souvent à l'endroit même où la substance est utilisée. C'est une opération longue qui peut durer une à plusieurs heures (Lavie 1975).

I-3-2-Par l'homme au niveau de la ruche :

La propolis peut être récoltée selon deux techniques diverses :

- Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence par température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux (Lavie 1975).
- Utilisation de différents dispositifs: grille moulée en matière plastique ou en métal. On pose cette grille comme couvre cadres. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis. Le moment idéal se situe après la récolte d'été, les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, sachant l'hiver proche (Evangelist-Rodrigues et al 2001, Krell 1996). Cette dernière technique est meilleure.

La quantité récoltée est très variable. Elle est sous la dépendance de facteurs qui conditionnent la propre récolte par les abeilles. Elle se situe en moyenne entre 100 et 300 g par ruche et par an. Cette propolis brute doit être purifiée avant toute utilisation (Lavie 1975).



Photo-2: Récolte de la propolis par l'abeille.



Photo- 3: Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche.

I-4-Aspects macroscopiques et microscopiques:

- La propolis se présente sous l'aspect d'une substance de consistance variable en fonction de la température. Dure et friable à 15°C, elle devient molle et malléable aux alentours de 25 à 45 °C et collante ou gluante en dessus, jusqu'à fondre vers 60 – 70°C en moyenne (vers 65 à 82 °C pour Makashvili). Mais le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C et au delà (Lavie 1975, Krell 1996).
- Chauffée doucement au bain-marie, elle se divise en 2 parties bien distinctes :
 - L'une visqueuse qui tombe au fond.
 - L'autre liquide (cire de propolis) qui surnage à la surface et trouve de nombreux usages dans le domaine apicole (Lavie 1975).
- De couleur très variable selon sa provenance, allant du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir en passant par toute une gamme de brun extrêmement riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.) (Lavie 1975, Krell 1996, Evangelist-Rodrigues et al 2001).
- De saveur souvent âcre et parfois amère (Makashvili 1978, Metzner et al 1997, Nikolaev 1978).
- D'odeur variable selon son origine, en général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille...etc.) (Evangelist-Rodrigues et al 2001, Metzner et al 1997). Si elle est brûlée, elle dégage une odeur d'encens très délicate et très recherchée en rapport avec les résines aromatiques (Nikolaev 1978).
 - La structure microscopique de la propolis est maintenant assez bien connue grâce à un important travail de Marchenay 1978, réalisé au microscope électronique à balayage, et portant sur des échantillons de provenance de la France entière. Les résultats montrent que l'on retrouve toujours les mêmes microstructures et en nombre très limité, pour des propolis d'origines fort différentes. Ce qui prouve, d'après cet auteur, le rôle très important des abeilles ouvrières dans la formation de la structure de ce produit.
- La propolis est peu ou pas soluble dans l'eau. Selon Bankova et al 1998 quelques composants de la propolis sont solubles dans l'eau bouillante.
- Elle est soluble partiellement dans l'alcool (éthanol, méthanol) (Lavie 1975, Justin 1996), l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, le glycol ...etc. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Lavie 1975).
 - Le pourcentage d'impureté est de 18 à 34 % (Makashvili 1978).
 - Le pourcentage d'humidité est de 5,07 % (Evandro et al 2001).

I-5-Composition chimique:

La composition chimique de la propolis est extrêmement complexe. Elle est composée essentiellement de cire, résine et produits volatiles. La cire est sécrétée par les abeilles. Les deux autres composants proviennent des sécrétions des plantes butinées lors de la collecte de la propolis (Marcucci 1995).

La composition chimique de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs. Plusieurs travaux ont été effectués sur des propolis de différents pays et ont abouti aux conclusions suivantes : la composition chimique de la propolis varie selon l'origine botanique (Bankova et al 2000, Negri et al 2000, Popova al 2002), l'espèce d'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique (Ghisalberti 1979), mais elle présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable (Justin 1996).

D'une manière générale la propolis est composée de 45 à 55% de résine contenant principalement des flavonoides et des acides phénoliques ainsi que leurs esters (Bankova et al 1982, 1992), 25 à 35% de cire, 5% de pollen (Metzner et al 1997) et 5% d'autres composés organiques avec comme minéraux: calcium, magnésium, fer , zinc, silice, potassium, phosphore, manganèse, cobalt (Metzner et al 1997) et vitamines: A, B₁, B₂, B₃, C, E, H et la vitamine P (Ghisalberti 1979, Ivanov 1980).

La composition chimique étant différente selon la zone géographique, les propolis des zones tropicales et tempérées présentent donc des constituants différents.

I-5-1-Composition chimique de la propolis des zones tempérées :

Dans les régions tempérées où le peuplier est considéré comme la principale source de la propolis, les constituants majeurs sont les polyphénols : flavonoïdes aglycones, acides phénoliques et leurs esters (Kujumgiev et al 1999).

Des études concernant la propolis d'Egypte ont identifié une nouvelle classe de composés : des esters d'acide cafeique avec une chaîne d'alcool (dodecanol, tetradecanol, hexadecanol) (Christov et al 1998, Abd El Hady 1994) ont identifié les composés suivants dans la propolis de l'Egypte :

- des esters d'acides phénoliques (72,7%).
- Des acides phénoliques (1,1%).
- Dihydrochalcones (6,5%).
- Chalcones (1,7%).
- Flavonones (1,9%).

- Flavones (4,6%).
- Tetrahydrofuranes (0,7%).

Peu d'études ont été effectuées sur cette propolis, mais de nombreux travaux sont en cours pour identifier sa composition chimique.

I-5-2-Composition chimique de la propolis des zones tropicales :

Durant ces dernières années, la propolis des tropiques (spécialement celle du Brésil) a fait l'objet de plusieurs études chimiques, ce qui a permis l'identification de plusieurs composés. L'investigation des propolis tropicales et leur comparaison avec les propolis d'Europe qui ont pour origine des plantes complètement différentes, montre que les flavonoïdes sont les composés les plus importants (flavones et flavonones) (Bankova et al 1982 et 1988). Cette propolis contient aussi des acides *P.* coumariques et leurs dérivés avec un résidu cyclique (Tazawa et al 1998), des dérivés d'acetophenones (contenant un substituant prenyl (Bohelman et al 1981, Bankova et al 1998, Valcic et al 1998, Christov et al 1999), des dérivés d'acides caffeoyl quinique (Basnet et al 1996, Tatefuji et al 1996), des acides diterpéniques (de type labdane et cleodane) (Bankova et al 1996, Banskota et al 1998, Matsuno et al 1997 et 1998), des triterpènes (Markham et al 1996) et des mono et sesquiterpènes (Bankova et al 1998). Dans leurs revues Marcucci 1995 et Bankova et al 2000 ont cité plus de 300 composés identifiés. Des études plus récentes ont apporté plus de lumière sur la composition chimique de la propolis.

I-6-Propriétés thérapeutiques :

La propolis possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. L'ensemble des recherches effectuées à ce jour permet de montrer plusieurs propriétés biologiques de ce produit. Ces propriétés sont en rapport avec la composition chimique. Nous ne parlerons dans notre travail que des propriétés les mieux connues et les plus souvent rencontrées.

-Activité antimicrobienne : De nombreuses études ont démontré l'effet d'inhibition de la propolis sur les souches Gram+, Gram- (Grange et Davey 1990, Rojas Hernandez et al 1993) et les bactéries anaerobies (Kedzia 1986, Boyanova et al 2006, Santos et al 2002). Cet effet dépend de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé (Ugur et Arslan 2004). De plus, la propolis possède des propriétés antifongiques (Ota et al 2001, Pepeljnak et al 1982, Cizmaric et Trupl 1976, Ozcan et al 2004), antivirales (Amaros et al 1992 et 1994, Maksimova-Todorova et al 1985, Escamu et al 1981), anti protozoaire et antiparasitaire (Higashi et al 1995).

-*Propriétés cicatrisantes* : La propolis possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire, la circulation, et la formation du collagène (Ghisalberti 1979). De plus, elle répare en un temps record l'épiderme abîmé (régénération de tissu) (Burdock 1998).

-*Propriétés anesthésiques* : La propolis est un puissant anesthésique (Burdock 1998, Metzner et Schneidewind 1997). Les études ont démontré que cette résine est 52 fois plus puissante que la cocaïne dans les tests sur les cornées de lapin (Ghisalberti 1979).

-*Propriétés anti oxydantes* : La propolis possède un effet antioxydant (Matsushige et al 1995, Hayashi et al 1999, Moreno et al 2000) dû à la présence de benzyl cafféate (Yamauchi et al 1992), flavonoïdes (Krol et al 1990) qui ont un énorme pouvoir antioxydant.

De nombreux travaux ont montré l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité des médicaments anticancéreux (Lahouel et al 2004). De plus, la propolis possède un effet hépato protecteur contre la toxicité du paracétamol (Seo et al 2003), du CCl₄ (El-Khatib et al 2002) et de l'alcool (Lin et al 1999). Ces effets sont en rapport avec les propriétés antioxydantes de cette substance.

La propolis est aussi une substance aux propriétés :

- Anti-inflammatoire (De Almeida et Menezes 2002).
- anti-tumorale .
- anti-HIV (Ito et al 2001)
- Antimutagénique (Rao et al 1992).
- Antihypertensive.
- Hypoglycémiant (Fuliang et al 2005).

I-7-Toxicité :

Les études en rapport avec la toxicité de la propolis sont rares. Ghisalberti signale qu'elle n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si elle est consommée en quantités raisonnables. Avrouest-Grand et al 1994 ont reporté une DL₅₀ de 7340 mg/kg. Par contre, Hrytsenko et al 1977 ont reporté une DL₅₀ de 2050 mg/kg et une DL₁₀₀ de 2750 mg/kg. Cette différence peut être expliquée par une différence au niveau de l'extraction de cette substance (choix du solvant et pourcentage utilisé). L'administration orale de 200 à 1220 mg/kg/J d'extrait éthanolique de propolis (EEP) pendant 7-10 jours, n'entraîne aucun effet nocif (Higashi et De Castro 1995). De plus, l'extrait alcoolique de propolis incorporé dans l'eau potable (rat et souris) et utilisé aux doses 1875 et 2470 et 4000 mg/kg/J pendant 30, 60 et 90 jours respectivement, ne montre aucun effet toxique.

I-8-Conservation :

La propolis se conserve assez facilement, dans de bonnes conditions, sans précautions. Mais il paraît néanmoins préférable de la garder dans des récipients opaques, bien fermés et à l'abri de la lumière et de la chaleur (à 10 ou 12°C de préférence). De nombreuses expériences ont montré que le stockage de longue durée de la propolis ne diminue pas sa teneur en composants chimiques, ni ses activités biologiques (Krell 1996). Cependant, pour en obtenir de meilleurs effets et résultats, il vaut toujours mieux l'utiliser la plus fraîche possible. Il faut signaler enfin, que la lyophilisation de la propolis (dessiccation obtenue par congélation brutale à basse température, suivie d'une sublimation sous vide, permettant d'obtenir une poudre poreuse qui se conserve indéfiniment sous vide) maintient aussi ses propriétés biologiques.

Références :

- Abd El Hady, F. K (1994). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) study of the Egyptian propolis 2:-flavonoids constituents. *Egypt J Appl Sci* **9**, 91-109.
- Amaros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M (1992). In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* **23**, 231-40.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique* **4**, 462–468.
- Bankova, V., Popov, S., Marekov L (1982). High-performance liquid Chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J of Chromatography* **242**, 135-143.
- Bankova, V., Popov, S., Marekov, N., Manolova, N., Maksimova, V (1988). The chemical composition of propolis fractions with antiviral action. *Acta Microbiol. Bulg* **23**, 52-57.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., Zamjasan, Z (1992). Propolis produced in Bulgaria and Mangolia: phenolic composition and plant origin. *Apidologie* **23**, 79-85.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Pureb, O., Bocari, G (1994). Volatile constituents of propolis. *Z. Naturforsch* **49**, 6-10.
- Bankova, V., Christov, R., Delgado Tejer, A (1998). Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry* **49**, 1411–1415.
- Bankova, V., De Castro, S. L., Marcucci, M. C (2000). Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**, 3-15.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Prasain, J. K., Matsushige, K., Saiki, I., Kadota, Sh (1998). Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities, *J. Nat. Prod* **61**, 896- 900.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S (1996). Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoylquinic acids from propolis, *Biol Pharm Bull* **19**, 1479–1484.
- Bohlmann, F., Kramp, W., Grenz, M., Robinson, H., King, R (1981). Diterpenes from *Baccharis* species, *Phytochem* **20**, 1907–1913.
- Boyanova, L., Kolarov, M., Kilgova, G., Mitov, M (2006). In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* **12**, 173-177.
- Burdock, G. A (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology* **36**, 347-363.

- Challem, J (1995). Medical Journal Document Value of Bee Propolis, Honey and Royal Jelly. The nutrition reporter.
- Christov, R., Bankova, V., Hegazi, A., Abd El Hady, F., Popov, S (1998). Chemical composition of Egyptian propolis, *Z. Naturforsch* **53c**, 197–200.
- Cizmarik, J., Trupl, J (1976). Effect of propolis on bacteria. *Pharmazie* **31**, 656-7.
- Crane, E (1988). *Bee Keeping: Science, Practice and World Resources*, Heinemann, London.
- De Almeida, E. C., Menezes, H (2002). Anti-inflammatory activity of propolis extract: A review. *J of Venomous Animal and Toxins* **8**, 191-212.
- El-Khatib, A. S, Agha, A. M, Mahran, L. G, Khayyal, M. T (2002). Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo. *Z. Naturfosch* **57**, 379-85.
- Escanu, V., Prahoveanu, E., Cricsan, I., Cioca, A (1981). The effect of aqueous propolis extract on experimental influenza virus infection in mice. *Virologie* **32**, 213-5.
- Evandro, A., Nascimento, Leila, C. F. Bezzan (2001). Estudo da propolis do triangula part 1: Identificação dos constituintes solúveis em metanol / acetato de etila por CG-EM. *Mensagem Doce* 63.
- Evangelist-Rodrigues, A., Carneiro of Cunha. M (2001). Análise comparativa da qualidade da propolis coletado através de calços de madeira e tela plástica na região do byo paraibano. *Mensagem Doce* 63 (bis).
- Francisco A Tomas-Barberan., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Thomas-Lorente, F (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis From Venezuela. *Phytochem.* **1 (34)**, 191-196.
- Fuliang, H. U., Hepburn, H. R., Xuan, H., Chen, M., Daya, S., Radloff, S. E (2005). Effect of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with *Diabetes mellitus*. *Pharmacol Research* **51**, 147-52.
- Ghisalberti, E. L (1979). Propolis a review. *Bee World* **60**, 59-84.
- Grange, J. M, Davey, R. W (1990). Antibacterial properties of propolis. *Journal of The Royal Society of Medecine* **83**, 159-160
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World* **71**, 107-118.
- Hayashi, K., Komura, S., Isaji, N., Ohishi, N., Yagi, K (1999). Isolation of oxidative compounds from Brazilian propolis: 3,5-dihydro-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chemical Pharmacological Bulletin* **47**, 1521-1524.

- Hegazi, A. G 1997. Propolis an overview. International Symposium on Apitherapy Cairo 8-9th Egypt.
- Higashi, K. O, De Castro, S. L (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Ethnopharmacology **46**, 55-8.
- Hrytsenko, V. I, Tyjhnov, O., Pryakhin, R (1977). Study on the polysaccharide preparation propolis. Farmatseytychnyi Zhurnal **32**, 92-93.
- Ito, J., Chang, J. F., Wang, H. K., Park, Y. K., Ikegaki, M., Kilgore, N., Lee, K. H (2001). Anti-AIDS agents:(1)- anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. J. Natural Products **64**, 1278-81.
- Ivanov, T (1980). Composition and physico-chemical properties of propolis. Zhivotnovudni **17** (8), 96-103.
- Justin, O (1996). Bee products: chemical composition and application. Bee product: 15-26 Plenum Press: New York.
- Kedzia, A (1986). Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on anaerobic bacteria. Herba Polonia **32**, 53-58.
- Krell, R (1996). Value-Added products from beekeeping. FAO Agricultural services. Bulletin, n^o 124.
- Krol, W., Czuda, Z., Scheller, S., Gabry, J., Grabies, S., Shani, J (1990). Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. Biochem Int **21**, 593-597.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, L., Serkedjieva, Y., Bonkova, V. S., Christov, R and Popov, S (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol **64** (3), 235-40.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J. P (2004). The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxidation and increasing liver glutathione concentration. Pathologie Biologie **52**, 314-22.
- Lavie, P (1975). La propolis. Edition: Apimondia. Bucharest.
- Lin, S. C., Chung, C. Y., Chian, C. L., Hsu, S. H (1999). The influence of propolis ethanol on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. The American Journal of Chinese Medicine **27**, 83-93.
- Lopez, F. C., Bankova, V., Sforcin, J. M (2003). Effect of three vegetal sources of propolis on macrophages activation. Phytomedicine **10**, 343-343.

- Maciejewicz, W., Daniewski, M., Mielniczuk, Z., Suprynowicz, Z (1982). Gas chromatography-mass spectrometry investigation of propolis. Analysis of beta-steroids. *Acta Pol Pharm* **39**, 277-279.
- Makashvili, Z. A (1978). From the history of propolis in remarkable Hive product: Propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible In therapeutics. APIMONDIA standing commission on Beekeeping technology and equipment.
- Maksimova-Todorova, V., Manolova, N., Gegova, G., Serkedzhieva, Y., Uzunov, S., Pancheva, S., Marekov, N., Bankova, V (1985). Antiviral effects of some fractions isolated from propolis. *Acta Microbiologica Bulgaria* **17**, 79-85.
- Marchenay, P (1977). *La propolis*. Paris.
- Marcucci, M. C (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83-99.
- Markham, K. R., Mitchel, A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., Lu, Y (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochem* **42**, 205–211.
- Matsuno, T., Matsumoto, Y., Saito, M., Morikawa, J (1997). Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Z Naturforsch* **52c**, 702–704.
- Matsuno, T., Saito, M., Matsumoto, Y., Morikawa, J (1998). A new benzo- α -pyran derivative isolated from propolis. *Z Naturforsch* **53c**, 1037–1039.
- Matsushige, K., Kusumoto, I. T., Yamamoto, Y., Kadota, S., Namba, T (1995). Quality evaluation of propolis. 1-a comparative study on radical scavenging effects of propolis and *vespae nidus*. *J Trad Med* **12**, 45-53.
- Metzner, J., Schneidewind, E. M (1997). Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Pharmazi* **33** (7). German.
- Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R., Vattuone, M. A (2000). Comparaison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacology* **71**, 109-114.
- Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A. M., Salatino, L. F (2000). Comb and propolis waxes from Brazil (states of Sao Paulo and Panama). *J Braz* **1**, 5453-457.
- Nikolaev, A. B (1978). Defending the bee town. In remarkable hive product: Propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. APIMONDIA standing commission on Beekeeping technology and equipment,

Bucharest.

- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., Shimiz., M. T (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* **44**, 375-8.
- Ozcan, M (2004). Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. *J Med Food* **7**, 114-6.
- Park, Y. K., Matias de Alencer, S., Fonseca de Moura, F., Ikegaki, M (1999). Biological activities of propolis. *Revista OESP-Alimentação* : 27.
- Pepeljnjak, S., Maysinger, D., Jalsenjok, I (1982). Effect of propolis extract on some fungi. *Scientia Pharmaceutica* **50**, 165-7.
- Popova, M., Bonkova, V., Chimov, A., Sileva, M (2002). A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylan balsamum* trees. *Apidologie* **33**, 87-88.
- Rao, C. V., Desai, D., Kaul, B., Amin, S., Reddy, B. S (1992). Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions* **84**, 277-290.
- Rojas Hernandez, N. H., Candelario, M., Oliveras, E (1993). Antimicrobial activity of propolis against representatives of the genus *Mycobacterium*. *Revista Biologica (Habana)* **7**, 69-75.
- Santos, F. A., Bastos, E. M., Maia, A. B. R. A., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A (2003). Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research* **17**, 285-289.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzed, M., Carvalho, M. A. R, Farias, L. M., Moreira, E. S. A., Braga, F. C (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J of Ethnopharmacology* **80**, 1-7.
- Seo, K. W., Park, M., Song, Y. J., Kim, S. J., Yoon, K. R (2003). The protective effect of propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytother Res* **17**, 250-3.
- Tatefuj, T., Izumi, N., Ohta, T., Arai, Sh., Ikeda, M., Kurimoto, M (1996). Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull* **19**, 966-970.
- Tazawa, S. H., Warashina, T., Miyase, T (1998). Studies on the constituents of Brazilian propolis. *Chem Pharm Bull* **46**, 1477-1479.
- Ugur, A., Arslan, T (2004). An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Med Food* **7**, 90-94.

-Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblan, S., Singh, M., Maiese, W. M., Timmerman, B. N (1999). Phytochemical, Morphological and Biological investigation of propolis from Central Chile. *Z.Naturforsch* **54c**, 406-416.

-Valcic, S., Montenegro, G., Timmermann, B (1998). Lignans from Chilean propolis. *Journal of Natural Product* **61**, 771–775.

-Yamauchi, R., Kato, K., Oida, S., Kanaeda, J., Ueno, Y (1992). Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Bioscience Biotechnology and biochemistry* **56**, 1321-2.

Chapitre-II :
Les métalloprotéinases
Matricielles

II-1-Introduction :

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou matrixines constituent une des quatre familles du groupe des métzincines. Ces enzymes sont des endopeptidases zinc-dépendantes, capables de dégrader des constituants de la matrice extracellulaire (Bode *et al* 1993). Leurs caractéristiques communes sont :

- Similarité de structure primaire (comportant plusieurs domaines distincts, conservés à travers les différents membres de la famille).
- présence d'ion Zn^{2+} au niveau de leur site catalytique.
- sécrétion sous forme de proenzyme (zymogène).
- inhibition par des inhibiteurs tissulaires spécifiques, appelés TIMPs.
- propriétés de dégradation d'au moins un composant de la matrice extracellulaire.

En plus des substrats matriciels, les MMPs sont capables de cliver les molécules présentes à la surface cellulaire et les protéines péricellulaires non matricielles. Ces propriétés leur permettent de réguler de nombreux processus physiologiques (angiogénèse, embryogénèse....) et pathologiques (inflammation, fibrose, destruction articulaire....). L'activité de ces enzymes est associée à la genèse de maladies dégénératives, à l'invasion tumorale et à la réparation tissulaire. Les métalloprotéinases matricielles interviennent aussi dans la modulation des interactions cellule-matrice impliquant ainsi ces enzymes dans de nombreux processus tel que : la différenciation cellulaire, la migration, l'apoptose et la régulation de l'activité des facteurs de croissance (Bosbaum *et al* 1995).

II-2- Classification :

Actuellement, 21 MMPs humaines ont été identifiées, clonées, caractérisées et classées en cinq groupes en fonction de leur structure, de leur spécificité de substrat et de leur localisation (Sternlicht *et Werb* 2001). On distingue : les gélatinases, les collagénases, les stromylysines, les métalloprotéinases de type membranaire (MT-MMPs) et les autres MMPs (tableau-1).

Tableau-1 : Classification des métalloprotéinases matricielles.

Enzyme	MMPs	Poids moléculaires (kDa)		Substrats
		Forme latente	Forme activée	
Collagénase Interstitielle	MMP-1	55	45	Collagènes de type I, II, III, VII, X, gélatine, entactine, ténascine, aggrecane, pro-MMP-2, pro-MMP9, II-1.
Collagénase du polynucléaire neutrophile	MMP-8	75	58	Collagènes de type I, II, II, aggrecane
Collagénase-3 Gélatinase-A	MMP-13	60	48	Collagènes de type I, II, II Collagènes de type I, VI, V, VII, X, gélatine, fibronectine, laminine, aggrecane, élastine, proMMP-13, pro-MMP-9, TNF- α , II-1
	MMP-2	72	68/66	
Gélatinase B	MMP-9	92	84	Collagènes de type IV, V, gélatine, élastine, entactine, aggrecane, BP180, II-1
Stromélysine	MMP-3	54	50/48	Collagènes de type II, III, IV, V, IX, X, XI, gélatine, laminine, fibronectine, élastine, ténascine, aggrecane, pro-MMP-1, pro-MMP-9, pro-collagénase du PNN, II-1.
Stromélysine-2	MMP-10	54	50/48	Collagènes de type IV, laminine, fibronectine, élastine, aggrecane, Pro-MMP-1, Pro-MMP-8 1-PI
Stromélysine-3 Matrilysine	MMP-11	65	45/28	Collagènes de type IV, gélatine, laminine, fibronectine, antactine, élastine, aggrecane, ténascine, Pro-MMP-9 et -2 Pro-collagénase interstitielle
	MMP-7	28	19	
MT1-MMP	MMP-14	63	?	Pro-MMP-2, collagènes de type I, IV, V, gélatine, fibronectine, ténascine
MT2-MMP	MMP-15	76	?	Pro-MMP-2, fibronectine, ténascine
MT3-MMP	MMP-16	70	?	Pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	?	?	?
MT5-MMP	MMP-24			
MT6-MMP	MMP-25			
Métalloélastase	MMP-12	54	45/22	Elastine
	MMP-19			Aggrecane
Enamelysine	MMP-20			Aggrecane
	MMP-23			
	MMP-26			
Epilysine	MMP-28			Caséine

-Les collagénases dégradent spécifiquement les collagènes fibrillaires (de type I, II et III) entraînant le déroulement de l'hélice α et libérant ainsi un collagène dénaturé pouvant être dégradé par les gélatinases.

- Les gélatinases dégradent les collagènes de type IV et V, les collagènes de type I et III dénaturés.

-Les stromelysines possèdent une spécificité de substrat très large et peuvent hydrolyser les protéoglycannes, les laminines et la fibronectine. Elles sont également capables de dégrader le domaine globulaire des collagènes de membrane basale (Okada *et al* 1988).

- Les métalloprotéinases de type membranaire ou MT-MMPs, récemment décrites, possèdent un domaine transmembranaire (Puente *et al* 1996, Sato *et al* 1994, Takino *et al* 1995). Leur activité protéolytique vis-à-vis des substrats de la matrice extracellulaire a récemment été mise en évidence.

II-3-Structure :

De façon générale, les MMPs contiennent un prédomaine (préprotéine) N-terminal, dont le clivage se produit à l'intérieur de la cellule constituant ainsi un signal de sécrétion pour la protéine. Ce prédomaine est suivi d'un propeptide qui maintient l'enzyme sous forme latente. Le clivage de ce propeptide par protéolyse entraîne l'activation du zymogène. Le domaine catalytique contient le site de fixation du zinc et une région « hinged » reliant le site catalytique au domaine C-terminal ou « hemopexine-like » (appelé PEX). Hormis la MMP-7 (matrilysine), la MMP-26 (endométase) et la MMP-23 toutes les MMPs possèdent un domaine PEX. Ce domaine module les liaisons des MMPs aux TIMPs, à certains substrats ainsi que leur activité protéolytique (Barret *et al* 1998). La longueur de la région « hinged » varie selon la MMP et influence également la spécificité de substrat (Knauper *et al* 1996).

Le domaine catalytique des gélatinases A et B est caractérisé par l'insertion de trois répétitions en tandem d'un module fibronectine de type II (FnII) riche en cystéine. Ce domaine permet la liaison de l'enzyme et le clivage ultérieur du collagène et de l'élastine (Murphy et Crable 1995). Enfin, les MT-MMPs se distinguent par la présence d'un domaine transmembranaire permettant leur ancrage à la membrane plasmique et un court domaine C-terminal ou une région hydrophobe de type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) membranaire (MMPs 17 et 25) (Sternlicht et Werb 2001).

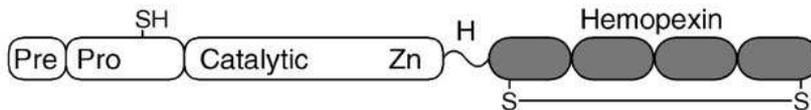
Les sites de liaisons du substrat peuvent être au niveau du domaine catalytique ou hors de ce domaine. Ces derniers sont nommés « ectodomaine » ou « exosite ». Des exosites ont été décrites au niveau du domaine hemopexine et des trois domaines FnII des gélatinases (Overall *et al* 2004).

A) Minimal Domain MMPs (MMP7/matrilysin, MMP26/endometase)

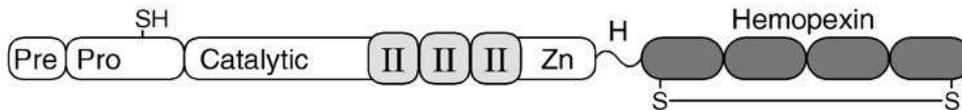


B) Simple Hemopexin Domain-Containing MMPs

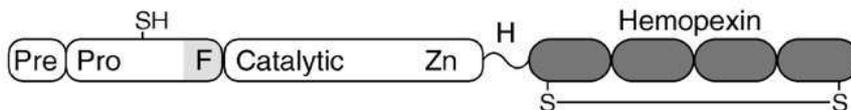
(MMP1/collagenase-1, MMP8/collagenase-2, MMP13/collagenase-3, MMP18/collagenase-4, MMP3/stromelysin-1, MMP10/stromelysin-2, MMP27, MMP12/metalloelastase, MMP19/RASI-1, MMP20/enamelysin, MMP22/CMMP)



C) Gelatin-binding MMPs (MMP2/gelatinase A, MMP9/gelatinase B)

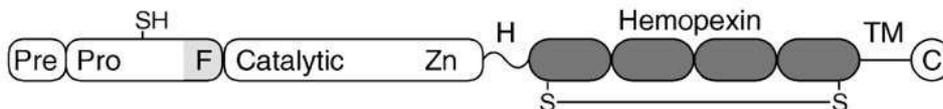


D) Furin-activated Secreted MMPs (MMP11/stromelysin-3, MMP28/epilysin)

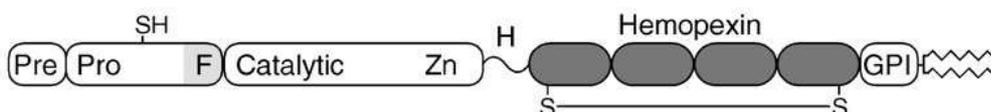


E) Transmembrane MMPs

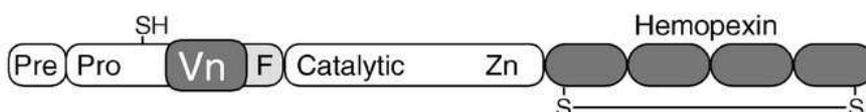
(MMP14/MT1-MMP, MMP15/MT2-MMP, MMP16/MT3-MMP, MMP24/MT5-MMP)



F) GPI-linked MMPs (MMP17/MT4-MMP, MMP25/MT6-MMP)



G) Vitronectin-like Insert Linker-less MMPs (MMP21/XMMP)



H) Cysteine/Proline-Rich IL-1 Receptor-like Domain MMPs (MMP23)

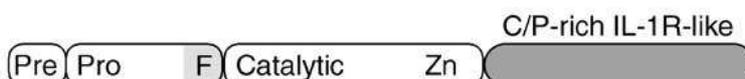


Figure- 1: structure des MMPs (d'après Sternlicht MD et Werb Z 2001)

II-4- La stromélysine-1 (MMP-3) :

La stromélysine-1 est une métalloprotéase des cellules stromales capable de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (Barret *et al* 1998, Woessner et Nagase 1995). Cette enzyme dégrade un grand nombre de protéines de la MEC : aggrecane, fibronectine, laminine, collagènes de type III, et IV, IX et X. A l'inverse de la MMP-1, la MMP-3 est incapable de dégrader les collagènes de type I et II, ce qui permet de les différencier. La MMP-3 active également les procollagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) et la pro MMP-9.

La MMP-3 est synthétisée sous la forme d'une préproenzyme avec un peptide de 17 acides aminés, un prodomaine de 82 acides aminés, un domaine catalytique de 165 acides aminés, une région charnière de 25 acides aminés et un domaine C-terminal de 188 acides aminés. Les masses moléculaires des formes proenzyme et active sont de 57 et 48 kDa respectivement. Des formes de 60 et 65 kDa existent, ces formes correspondent à la préforme et la forme active glycosylée (Wilhem *et al* 1987). Les composés organomercurels, les protéinases (trypsine, chymotrypsine, tryptase, plasmine, kallikeïne plasmatique, élastase leucocytaire) et la chaleur activent la pro-MMP-3.

L'activation par les protéinases entraîne une première coupure dans une zone située au centre du prodomaine. Un autoclivage de la liaison His⁸²#Phe⁸³ permet l'obtention de la forme totalement active. L'autolyse libère le domaine C-terminal et génère une forme de 28 kDa encore active. Les formes de 28 et 48 kDa possèdent la même spécificité de substrat (Okada 1988). La MMP-3 est faiblement distribuée et peu exprimée par les cellules en culture. Son gène est localisé sur le chromosome 11. L'expression des ARNm codant pour ce gène est induite par l'IL-1, le TNF α ou les esters de phorbol (Sternlicht *et al* 1999).

II-5- Activation des MMPs :

La plupart des MMPs sont synthétisées sous formes zymogènes (inactifs) et doivent être activées pour exercer leurs rôles. L'absence d'activité enzymatique des formes zymogènes résulte de l'interaction entre le zinc du site actif et un résidu de cystéine présent dans le domaine de la molécule. L'activation enzymatique correspond à la rupture du pont ionique Cys-Zn²⁺ reliant le groupement-SH- de la cystéine à l'ion Zn²⁺ et à la fixation d'une molécule d'eau sur l'atome de zinc, suivie d'une auto-protéolyse libérant le domaine C-terminal. La rupture de cette interaction Cys-Zn²⁺ « cystein-switch » peut se produire sous l'influence d'agents chimiques (composés soufrés, organomercurels, espèce réactive de l'oxygène.....), par des agents physiques comme la chaleur (Koklitis *et al* 1991) ou par clivage protéolytique.

Plusieurs sérines protéases comme la plasmine et la trypsine peuvent activer certains MMPs (Okada et Nakashini 1989, Rice et Banda 1995) (Figure-2).

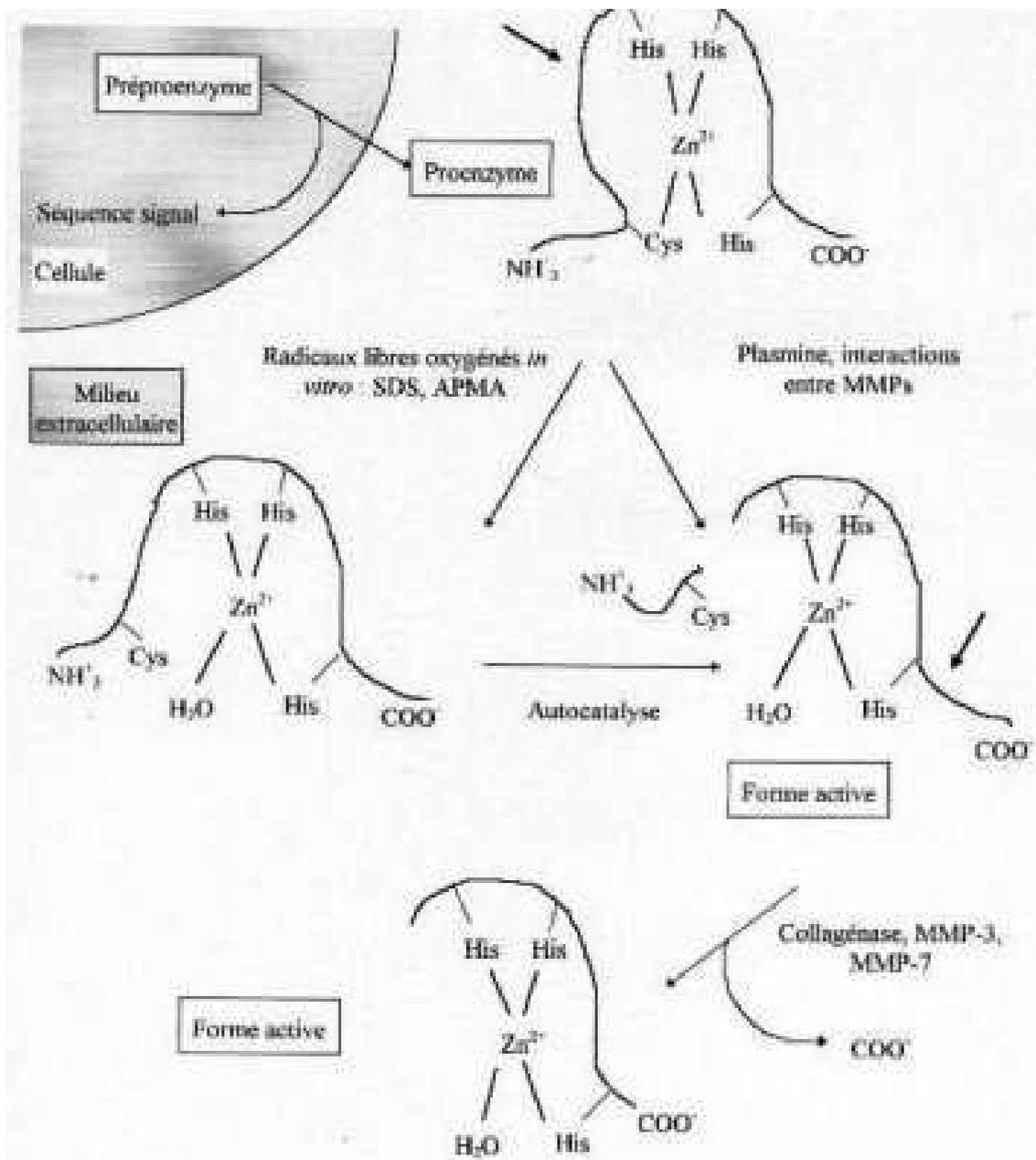


Figure-2 : Activation des MMPs

Le mécanisme d'activation des MMPs n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, quatre voies d'activation sont décrites :

1-L'activation extracellulaire des MMPs par des protéinases (non MMPs) : elle fait intervenir la cascade de la plasmine et peut se produire à la surface cellulaire via le récepteur de l'uPA ou être distant du site de sécrétion de l'enzyme (He *et al* 1989). Dans ce système, le plasminogène est clivé en plasmine par l'uPA ou tPA, la plasmine ainsi formée peut alors activer totalement la stromélysine et partiellement la collagénase interstitielle. La stromélysine active peut augmenter l'activité de la collagénase interstitielle par un clivage d'un peptide de l'extrémité C-terminale de la molécule.

2-L'activation extracellulaire des MMPs par d'autres MMPs. La matrilysine a été décrite comme étant capable d'activer la pro MMP-9 (Fridman *et al* 1995).

3-L'activation extracellulaire par la furine. Cette enzyme est une sérine protéase qui reconnaît certaines séquences portées par les stromélysine 1, 2, 3 et les MT-MMPs. Ce type d'activation n'a été montré que pour la prostromélysine-3 et la MT1-MMP (Sato *et al* 1996).

4-L'action des MMPs par les MT-MMPs. Ce mécanisme concerne la pro MMP-2 uniquement. L'activation de cette enzyme se produit à la surface cellulaire et fait intervenir un complexe tertiaire entre la MT1-MMP, le TIMP-2 et la pro MMP-2 (Emonard *et al* 1992, Kinoshita *et al* 1998).

II-6-Régulation de l'activité des MMPs :

Les MMPs peuvent être régulées à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel ou extra-cellulaire. La plupart des MMPs peuvent être régulées au niveau transcriptionnel, à l'exception de la MMP-2 dont l'expression constitutive est régulée à travers sa cascade d'activation. A ce niveau de nombreux facteurs peuvent réguler de manière positive ou négative l'expression des MMPs tel que le stress cellulaire, les changements de morphologie, les facteurs de croissance ainsi que beaucoup d'autres facteurs (EGF, bFGF, VEGF ou l'inducteur cellulaire des MMPs EMMPRIN.....).

Des mécanismes post-transcriptionnels peuvent également influencer l'expression des MMPs. Les interactions entre les différentes cellules et la matrice peuvent également agir à ce niveau. Au niveau des fibroblastes, le TGF- β entraîne une augmentation considérable de la demi-vie des ARN messagers de la MMP-2. Par contre, celle des ARNm du TIMP-1 ne varie pas (Overall *et al* 1991). La stabilité des ARNm de la MMP-2 induite par le TGF- β peut être expliquée par la présence d'une séquence (AUUUA) dans la région 3' non transcrite de ce gène (Shaw *et Kamen* 1986). In vivo, l'activité des MMPs est contrôlée par des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases appelés TIMPs. A ce jour quatre TIMPs différents ont été

identifiés (TIMP-1, 2, 3 et 4) (Gomez et al 1997, Murphy et Crable 1995, Brew et al 2000). Ils jouent un rôle important dans le contrôle de la dégradation et le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire, en limitant l'activité des MMPs. Les TIMPs sont des inhibiteurs endogènes réversibles des MMPs.

L' α 2-macroglobuline peut également inhiber des MMPs. C'est l'inhibiteur majeur des MMPs au sein des fluides tissulaires. Les TIMPs par contre agissent au niveau local dans l'espace extra et péri-cellulaire. Récemment, d'autres molécules capables d'inhiber les MMPs ont été identifiées, comme le fragment C-terminal du clivage du PCPE (procollagen C-terminal proteinase enhancer protein). Ce fragment a des similarités structurales avec les TIMPs (Sternlicht et Werb 2001). De nombreux inhibiteurs ont été également développés afin de contrôler l'activité des MMPs (Woessner et Nagase 2000).

Des essais en phase clinique sont actuellement en cours et différentes stratégies sont envisagées pour l'utilisation de ces inhibiteurs en complément des protocoles standards de traitement des cancers (Nelson et al 2000).

II-7- Le système plasminogène/ plasmine (Plg/Pm) :

Le système plasminogène / plasmine est composé de plasminogène, plasmine et des activateurs (Pas) et inhibiteurs de plasmine (PAIs) (Barret et al 1998). Le plasminogène correspond à la forme zymogène de la plasmine. Il est présent en forte concentrations (1-2 μ M) dans le plasma et la matrice extracellulaire (Plow et Miles 1999). Le plasminogène est constitué d'une chaîne polypeptidique monocaténaire de 791 acides aminés (Figure -3). Des formes glycosylées majeures ont pu être mise en évidence.

La plasmine est l'enzyme responsable de la digestion du caillot de fibrine (Barret et al 1998). La fibrine et le fibrinogène sont les substrats physiologiques majeurs de la plasmine. De plus, elle peut se lier à la membrane des cellules ou elle agit directement sur les protéines de la MEC, telles que la fibronectine, la laminine, les protéoglycanes et le collagène de type IV (Wiman et Collen 1977). Cette enzyme est formée de deux chaînes peptidiques liées entre elles par deux ponts disulfures : une chaîne lourde ou chaîne A et une chaîne légère ou chaîne B (Figure-3).

La plasmine est synthétisée sous forme d'un précurseur, le plasminogène. La conversion du plasminogène en plasmine est obtenue par clivage protéolytique. Deux activateurs contrôlent ce clivage : un activateur de type urinaire ou urokinase (uPA) et un autre de type tissulaire (tPA).

Enfin, l'activité de la plasmine et des PAs est contrôlée par des inhibiteurs endogènes : l' α 2-antiplasmine (α 2-AP) et la protease nexin I (PN-I). Ces inhibiteurs sont présents en forte

concentrations dans le plasma où ils opèrent efficacement lorsque des taux anormalement élevés de protéines sont présents. Il existe 2 types de PAIs : PAI-1 et PAI-2. Le PAI-1 est sécrété sous forme active. Cependant, il est rapidement converti en une forme latente (inactive) qui peut être réactivée après exposition aux phospholipides (Seiffert et al 1990). Le PN-I inhibe l'uPA, la plasmine et la thrombine. Il peut affecté le métabolisme du milieu extracellulaire en inhibant la déposition de fibrine (Vassalli et al 1991).

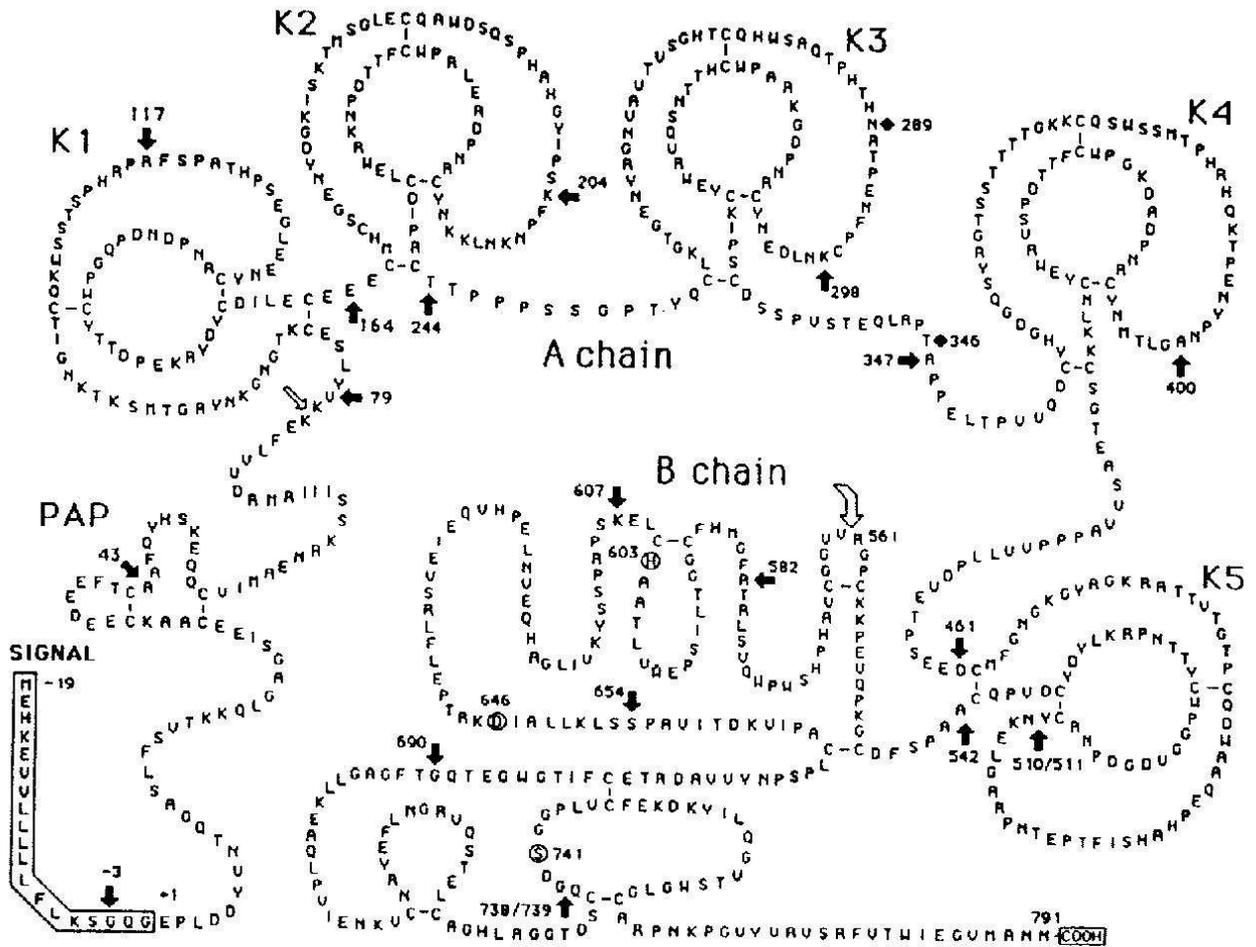


Figure-3 : Structure primaire du plasminogène

(D'après Copper DN et Krawczak M 1997).

II-8- Les activateurs du plasminogène :

Les activateurs du plasminogène sont des sérines protéases. Deux enzymes ont été identifiées l'uPA et le tPA. L'uPA est synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif (pro-uPA) formé d'une seule chaîne (sc-uPA) (Petersen *et al* 1988). L'activation de la proenzyme est obtenue par clivage d'une seule liaison. Cette réaction est catalysée par la plasmine, mais également par d'autres sérines protéases telles que la trypsine, la kallikeine plasmatique et la cathepsine G (Kobayashi *et al* 1991).

L'uPA comporte différents domaines : un domaine similaire à l'EGF, un domaine kringle et un domaine catalytique. Cette enzyme se lie à la membrane cytoplasmique des cellules au niveau de son récepteur spécifique (uPAR) grâce au domaine similaire à l'EGF. Le récepteur de l'uPA est une glycoprotéine ancrée à la membrane cytoplasmique par un groupement glycosylphosphatidylinositol. Les récepteurs de l'uPA ont été identifiés au niveau des monocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales et les kératinocytes. L'expression de ces récepteurs peut être modulée. Leurs nombres et leurs affinités varient en fonction des facteurs de croissance (Estreicher *et al* 1989).

Le tPA est sécrété sous forme d'une seule chaîne active (sc-tPA). Au niveau structural, c'est son domaine kringle qui permet la liaison de cette enzyme aux fibrines et aux autres composés de l'EMC (Gething *et al* 1988). Le tPA se lie au PAI et forme un complexe (Rijken *et al* 1990). Hajjar KA *et al* 1990 ont localisé le récepteur du tPA au niveau de la membrane cytoplasmique des neurones et des cellules endothéliales.

II-9- Système Plg/Pm et surface cellulaire :

L'existence de récepteurs spécifiques pour l'uPA, le plasminogène et la plasmine au niveau de la membrane cytoplasmique indique que la formation de ce complexe est localisée au niveau de la surface cellulaire. Ce complexe une fois activé déclenche toute une cascade de protéolyse. Dans un premier temps l'uPA est activé. Cette activation est augmentée en cas de présence simultanée du plasminogène à la surface cellulaire. Dans un deuxième temps l'uPA clive le plasminogène et libère la plasmine. Cette dernière est ainsi protégée de l'action de l' α 2-antiplasmine présente dans le plasma et les fluides extracellulaires (Plow EF et Miles LA 1990). La plasmine à son tour peut dégrader la fibrine ou participer à l'activation de certaines MMPs (Figure-4).

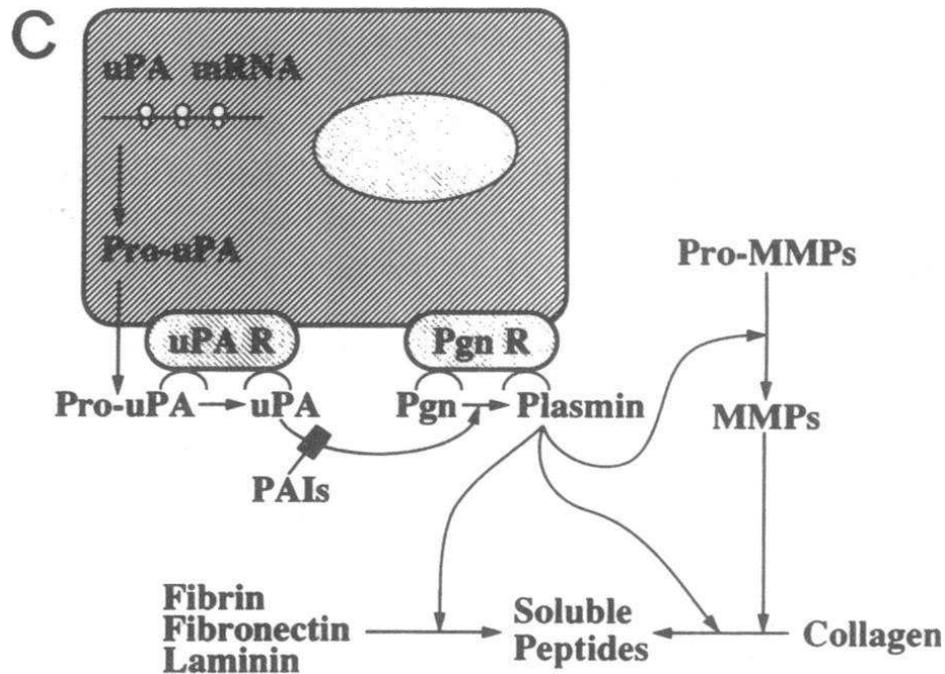


Figure-4 : expression du système plasminogène/ plasmine à la surface cellulaire
(d'après Vassalli JD et al 1991).

II-10-Contrôle de l'activité du système Plg/Pm :

Comme pour les MMPs, l'activité du système Plg/Pm peut être régulée à différents niveaux : signaux et voies de transduction du signal, transcription, activation par clivage protéolytique, présence à la membrane plasmique, inhibition de l'activité, endocytose.

Des régulations par signaux et voies de transduction ainsi qu'au niveau de la transcription ne semblent exister que pour l'uPA. Ce dernier ainsi que la plasmine sont secrétés sous forme de zymogène et leur activation nécessite un clivage protéolytique (Huet 2001). L'uPA peut être activé par la plasmine et catalyse ensuite la transformation du plasminogène en plasmine. Ainsi, cette activation conduit à un système d'activation réciproque et, en conséquence, à une amplification de la génération de plasmine (Ellis et al 1987).

Les PAIs sont impliqués dans le contrôle de ce processus : PAI-1, PAI-2 et l' α 2-AP qui inhibe la plasmine. La protéine LRP est impliquée dans les processus d'endocytose du système Plg/Pm. Cette protéine permet l'endocytose de toutes protéinases associées à l' α 2-macroglobuline (MMPs, plasmine, uPA) (Strickland et al 1995). De plus, PAI-1 peut aussi se lier à la LRP, permettant ainsi l'endocytose de complexes uPA/PAI-1 et également de complexes uPAR/uPA/PAI-1 (Huet 2001).

II-11- Les cascades protéolytiques :

Toutes les protéinases décrites précédemment peuvent dégrader indépendamment les unes des autres les protéines de la MEC. Cependant elles sont toutes synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs. L'activation d'une protéinase permet non seulement la dégradation de son substrat mais également l'activation d'une autre protéinase, d'où la notion de cascades protéolytiques (Murphy *et al* 1995) (Figure-5).

Le système Plg/Pm semble jouer un rôle pivot dans ces cascades protéolytiques. La génération de plasmine via l'uPA permet notamment l'activation de la MMP-3. L'activation de la MMP-1 fait également intervenir une cascade protéolytique où la plasmine et la MMP-3 interviennent. Cette cascade protéolytique a été aussi impliquée dans le processus d'activation de la MMP-9 (Ramos-DeSimone *et al* 1999). Dans les processus d'activation des gélatinases (MMPs-2 et -9), la plasmine permet non seulement l'activation de la MMP-9 mais également la seconde étape d'activation de la MMP-2 (Baramova *et al* 1997). L'implication du système Plg/Pm dans le processus d'activation de la MMP-2 semble substantielle puisqu'il permet également l'activation de la proMT1-MMP (Okumura *et al* 1997). Ce processus d'activation a lieu à la membrane cytoplasmique des cellules, où la plasmine est également impliquée dans la dégradation des protéoglycanes entourant les fibres de collagènes, augmentant ainsi l'accès des MMPs à leurs substrats. De plus, la plasmine est impliquée dans la protéolyse du TIMP-2, diminuant ainsi l'inhibition des MMPs (Farina *et al* 1998).

Les mécanismes conduisant à l'activation de ces cascades protéolytiques sont encore méconnus. La compréhension de ces mécanismes, de même que leur contrôle, sont essentiels pour des pathologies tels que les cancers, où les composants de ces cascades sont exprimés à la fois par les cellules tumorales et par les cellules stromales (Huet 2000).

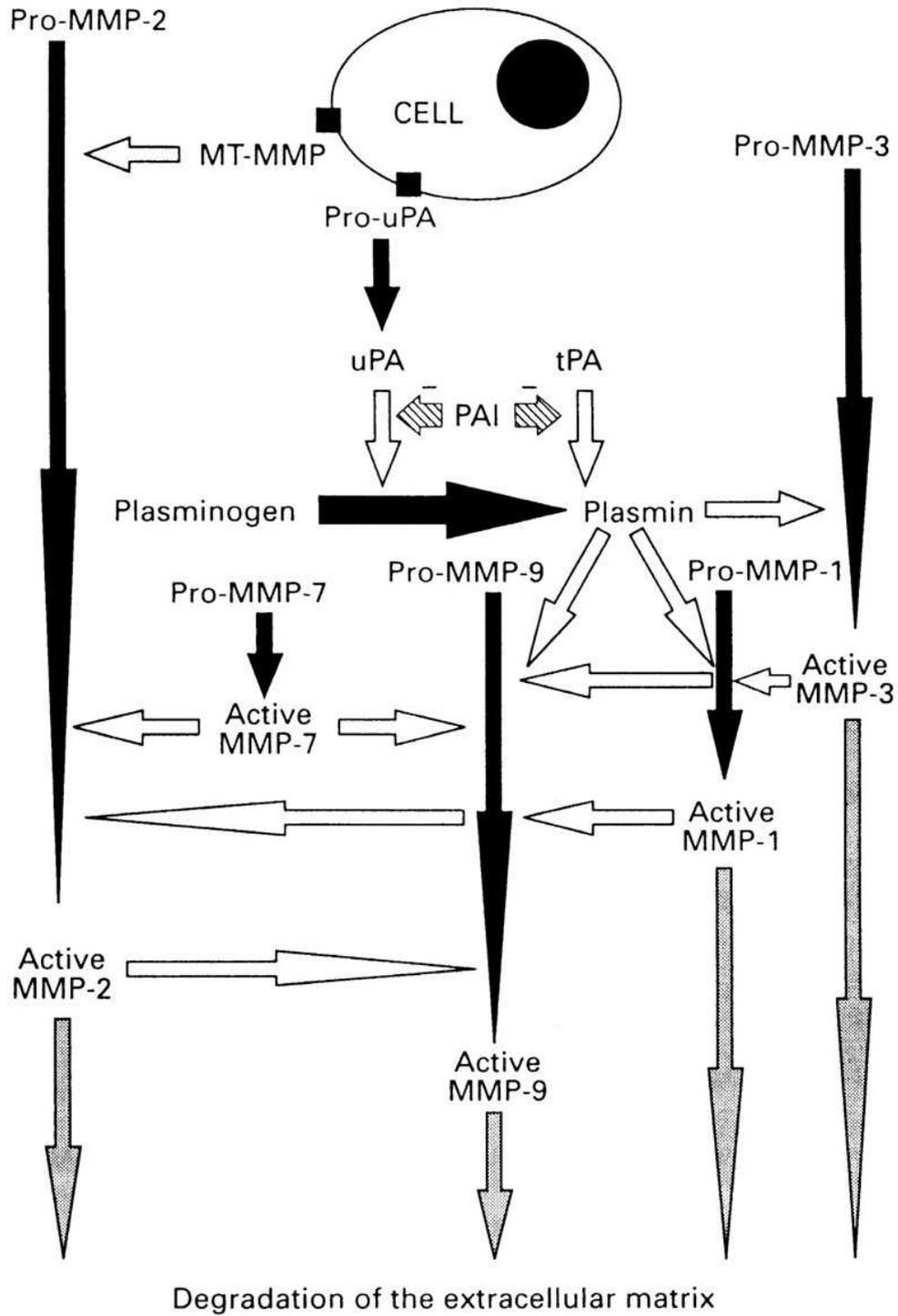


Figure-5 : Les cascades protéolytiques (D'après Parsons SL et al 1997).

II-12-Peau et vieillissement :

II-12-1- Structure de la peau :

La peau est un organe de revêtement recouvrant la totalité de la surface du corps en continuité avec les muqueuses au niveau des orifices naturels (Rouvière et Deimas 1994, Melissopoulos et Levacher 1998). La peau a pour fonction principale d'établir une barrière de protection contre les atteintes de l'environnement tout en permettant certains échanges avec le milieu extérieur. Elle joue également un rôle central dans la thermorégulation et la protection contre les rayons UV. La peau est le siège de nombreux processus métaboliques qui sont modulés par les conditions physiologiques de l'organisme et les conditions de l'environnement (Grosshan 1997).

Sur le plan structural, la peau est constituée de trois couches distinctes superposées qui sont, de la profondeur vers la surface :

- l'hypoderme (ou tissu adipeux sous-cutané)
- le derme, séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique
- l'épiderme (auquel sont rattachés les annexes épidermiques, follicules pilo-sébacés, ongles et glandes sudoripares) (figure-6).

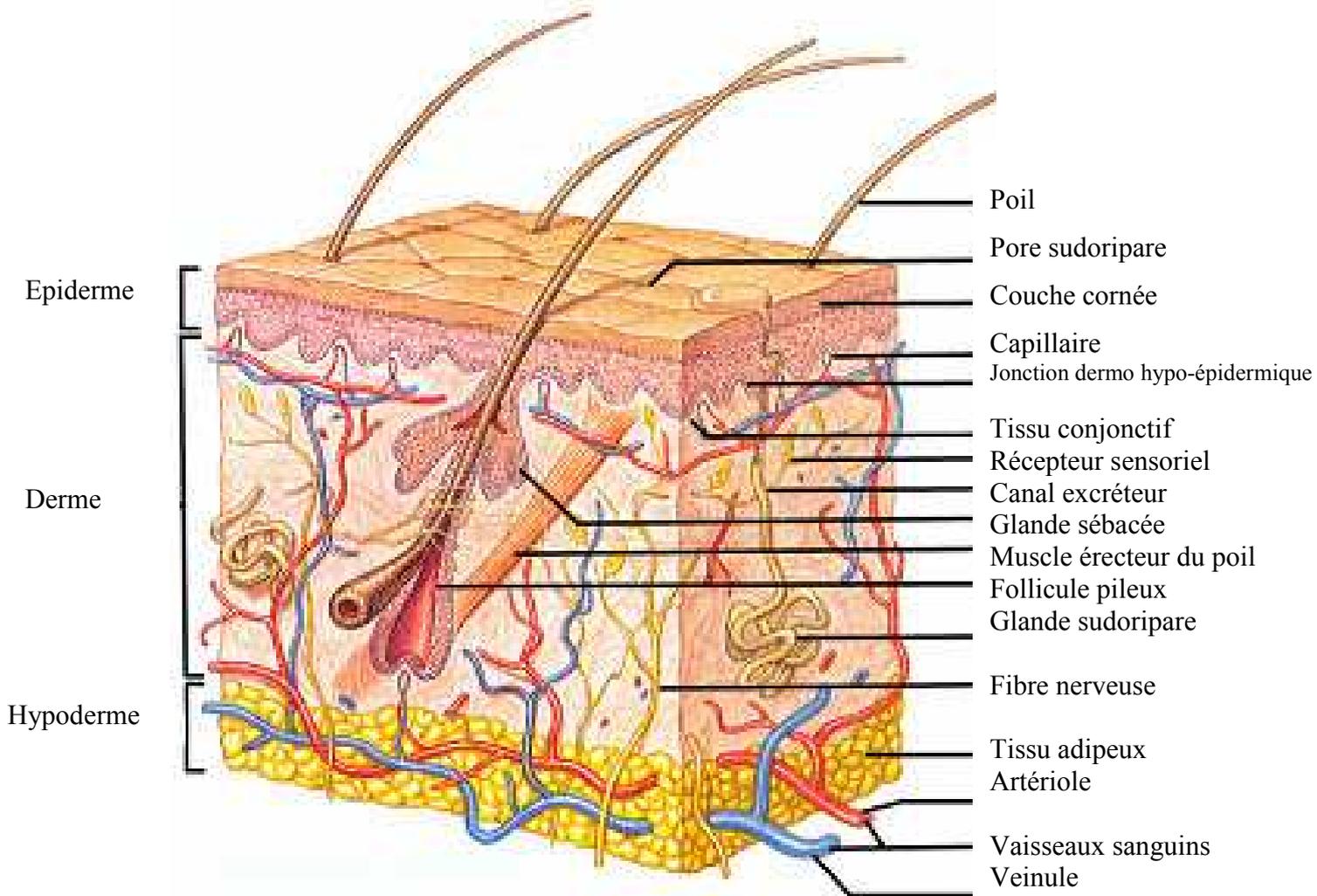


Figure -6: Structure de la peau (source : www.freethoughtforum.com/forum/article.php).

- **L'hypoderme :**

L'hypoderme est un tissu adipeux, matelas graisseux plus ou moins épais selon les régions du corps et le sexe, rattaché à la partie inférieure du derme par des expansions de fibres de collagènes et de fibres élastiques. L'hypoderme, par l'intermédiaire de ses cellules graisseuses, les adipocytes, stocke des lipides sous forme de triglycérides et fournit des acides gras en cas de demande énergétique. Il joue un rôle important dans la thermorégulation du fait du caractère isolant de la graisse (Grosshans 1997).

- **Le derme :**

Le derme, d'épaisseur très variable selon les régions du corps, est un tissu conjonctif fibro-élastique composé de cellules et de fibres baignant dans une substance amorphe appelée

substance fondamentale. L'ensemble fibres et substance fondamentale est regroupé sous le nom de matrice extracellulaire. Histologiquement, le derme est divisé en deux zones : une zone superficielle papillaire et une zone profonde réticulaire (Grosshans 1997).

Le derme est sillonné par un réseau veino-artériel. Il sert de support aux nerfs, aux vaisseaux et aux annexes épidermiques. Le tissu conjonctif dermique comporte une composante cellulaire et une composante matricielle. La composante cellulaire est constituée essentiellement de :

- ✓ fibroblastes, cellules essentielles du derme. Ces cellules produisent tous les éléments de la matrice extracellulaire. De plus, elles jouent un rôle dans la multiplication et la différenciation des kératinocytes.
- ✓ mastocytes qui interviennent dans la réponse immunitaire (avec les lymphocytes et les macrophages) et qui jouent un rôle dans la perméabilité vasculaire.

La composante matricielle est constituée de 4 types de macromolécules :

- ✓ Les protéines fibreuses comme les collagènes et l'élastine responsable de la résistance et de l'élasticité de la peau.
- ✓ Les protéoglycanes et les glycoprotéines matricielles qui jouent avec l'élastine un rôle dans la régulation et l'attachement de la peau

La jonction dermo-épidermique sépare l'épiderme du derme et assure la cohésion et les échanges entre ces deux tissus (Grosshans 1997).

- ***L'épiderme :***

L'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau. C'est un épithélium pluristratifié, kératinisé, comprenant différentes sortes de cellules : Kératinocytes, mélanocytes et cellules de langerhans (Rouvière et Deimas 1994).

-*Les kératinocytes :* Sont largement majoritaires ; ce sont des cellules épithéliales différenciées pour la synthèse des kératines. La différenciation des kératinocytes s'accompagne d'un ensemble de transformations morphologiques et biochimiques qui aboutissent à la formation des cornéocytes. Ainsi, au cours de leur maturation cornée les kératinocytes se répartissent en 4 couches :

- La couche basale:* considérée comme la plus importante dans la régénération épidermique.
- La couche malpighienne:* constituée de 5 à 10 assises superposées.
- La couche granuleuse:* joue un rôle dans la formation d'un manteau lipidique pericellulaire.

-*La couche cornée*: est un tapis de cellules mortes, assurant un rôle de barrière (Melissopoulos et Levacher 1998).

Les différentes couches de l'épiderme sont représentées dans la figure-7

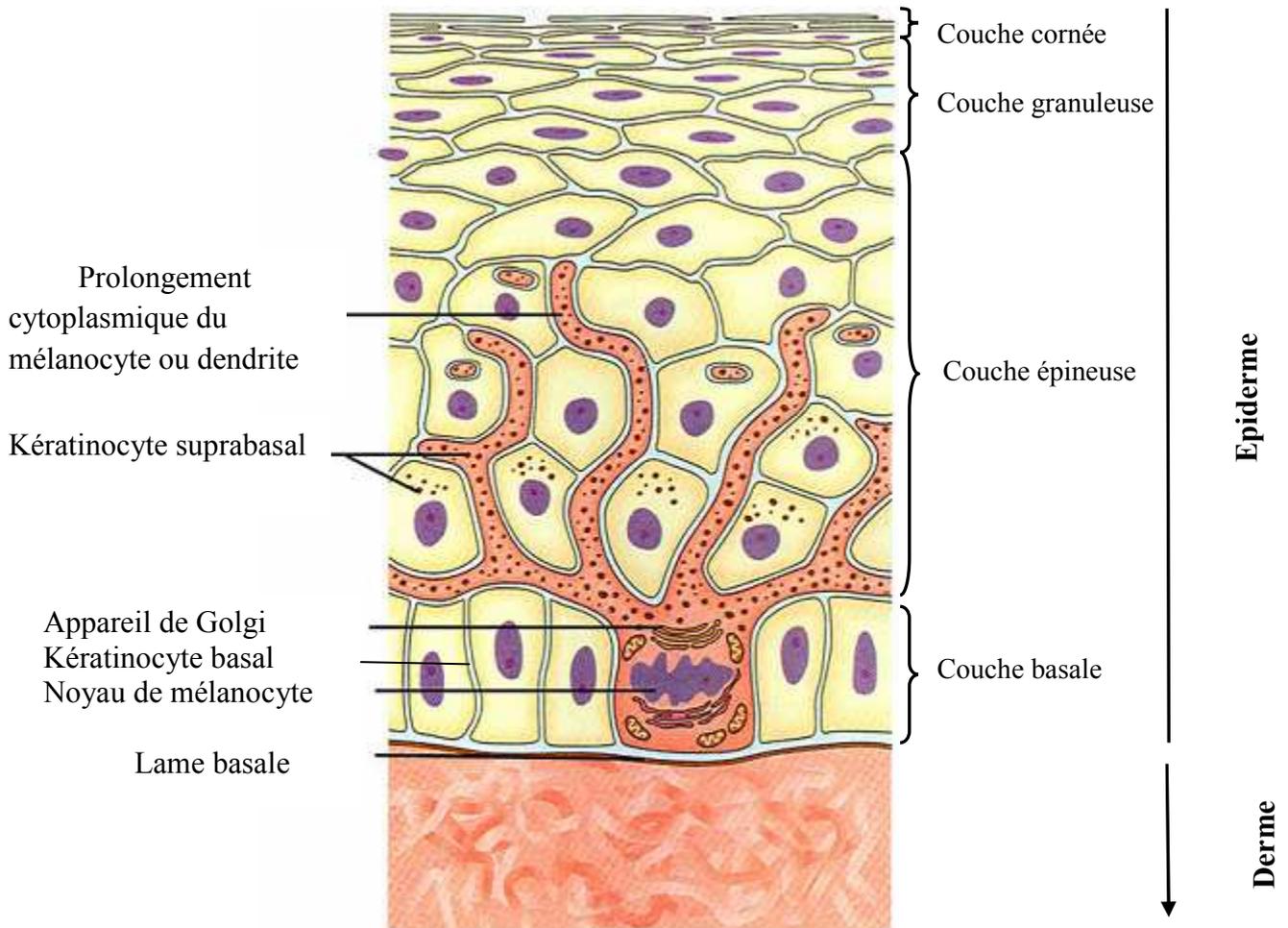


Figure-7 : Structure de l'épiderme (source : www.freethoughtforum.com/forum/article.php).

II-12-2- Matrice extracellulaire :

Selon les tissus, les fibroblastes vont synthétiser de manière plus ou moins abondante, les macromolécules composantes de la matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire dans laquelle sont insérés les fibroblastes, compose le tissu conjonctif.

La matrice extracellulaire du tissu conjonctif dermique est constituée de quatre types de macromolécules : les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines de structure et les protéoglycannes. La nature et la quantité de ces composants régissent les propriétés mécaniques de la peau normale et sont à l'origine des modifications physiopathologiques les plus visibles du relief cutané.

✓ *Les collagènes :*

Les protéines appartenant à la famille des collagènes sont les plus abondantes de l'organisme humain (25 à 30 % des protéines totales). Selon les tissus, elles peuvent représenter jusqu'à 80 % des protéines de la matrice extracellulaire et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus et organes chez l'homme (Ricard-Blum et Ruggiero 2005).

Plusieurs groupes ont été identifiés au regard de leurs structures et fonctions :

- les collagènes fibrillaires représentent environ 80 % du collagène dermique total,
- les collagènes FACIT (Fibril-Associated with Interrupted Triple helices),
- le collagène des membranes basales,
- deux autres collagènes particuliers, le collagène VI (à filaments perlés) et le collagène VII (formant des fibrilles d'ancrage),
- les collagènes à réseaux hexagonaux,
- les collagènes transmembranaires,
- les multiplexines (multiple triple helix domains and interruptions) s'associant aux membranes basales et
- d'autres collagènes encore mal connus (collagènes XVI, XXII et XXVIII).

✓ *L'élastine :*

L'élastine est un élément de la matrice extracellulaire qui, associé à une composante microfibrillaire, forme les fibres élastiques. Les fibres élastiques, composées à 95 % d'élastine, assurent les propriétés de souplesse et d'élasticité de tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques telles que les artères, les poumons ou la peau. Par ailleurs, les peptides issus de la dégradation de l'élastine possèdent de multiples activités biologiques, comme un pouvoir chimiotactique sur les cellules phagocytaires et la régulation de la prolifération de nombreux types cellulaires ou encore la stimulation de l'angiogenèse *in vitro* (Duca et al 2004, Robinet et al 2005).

✓ *Les glycoprotéines matricielles :*

Les glycoprotéines de la matrice extracellulaire possèdent des structures et des propriétés fonctionnelles très diverses. Les plus connues sont la fibronectine, les ténaescines, la vitronectine et les thrombospondines. Ces protéines participent à plusieurs fonctions grâce à la présence dans leur structure de domaines spécifiques et de séquence capables de reconnaître et de fixer spécifiquement des récepteurs à la surface cellulaire des protéines extracellulaires comme le collagène ou les protéoglycannes. Ces propriétés permettent à ces protéines de

participer aux interactions matrice-matrice ou cellule-matrice. Elles sont par conséquent impliquées dans les phénomènes de migration et d'adhésion cellulaires (Johansson 1996).

✓ ***Les protéoglycannes :***

Les protéoglycannes sont des macromolécules complexes de grande taille dont l'hydratation assure en grande partie la tonicité de la peau. Ils sont dispersés entre les fibres du tissu conjonctif dermique. Certains sont capables de s'agréger entre eux et/ou avec d'autres molécules de la matrice extracellulaire (collagènes, laminines, fibronectine), pouvant ainsi intervenir dans les interactions cellule-matrice. Ils peuvent également se lier à des facteurs de croissance ou se comporter en co-récepteurs de ces derniers. En étant ainsi capables d'interagir avec les facteurs de croissance, les protéoglycannes sont capables d'intervenir dans la modulation des comportements cellulaires, comme la prolifération, la différenciation, la migration.... etc (Gallo et al 1996)

II-12-3-Vieillessement cutané:

Le vieillissement est un phénomène biologique complexe qui peut être divisé en deux processus : un vieillissement intrinsèque déterminé génétiquement et un vieillissement extrinsèque causé par des facteurs environnementaux.

II-12-3-1- Vieillessement intrinsèque :

Le vieillissement intrinsèque de la peau est comparable au vieillissement des organes internes. C'est un phénomène inévitable dû au temps si bien qu'il est nommé aussi vieillissement chronologique. Ce vieillissement implique principalement des facteurs génétiques mais également des changements hormonaux ou des réactions métaboliques à l'origine de stress oxydatifs (Scharffetter-Kochanek et al 2000).

La peau devient fine, dû à un affinement du derme et de l'épiderme, lisse et manque d'élasticité. En effet, les fibres de collagènes se réorganisent et l'abondance des composants de la MEC diminue. De plus, le nombre de fibroblastes diminue et certains présentent une morphologie sénescence. Ces fibroblastes sénescents perdent leur capacité de synthèse et d'organisation des macromolécules du derme et en particulier le collagène et l'élastine. Des fibres collagéniques et élastiques mal organisées s'accumulent. Elles ne possèdent plus leurs propriétés physiques et donc ne peuvent plus remplir leur fonction de soutien. De plus, la production des métalloprotéinases matricielles augmente au cours du vieillissement (Rittie et Fischer 2002).

Des études plus récentes affirment que le vieillissement chronologique résulte de l'accumulation de dommages cellulaires dus à l'excès de radicaux libres oxygénés (RLO) générés au cours du métabolisme oxydatif. Les dommages cellulaires liés à ces radicaux libres

se matérialisent par de nombreuses mutations de l'ADN, l'oxydation des protéines ainsi que l'oxydation des membranes lipidiques, entraînant une altération de la signalisation transmembranaires (Jenkins 2002). Le tout concourant à la surproduction et à la suractivation des MMPs.

II-12-3-2- Vieillesse extrinsèque :

Le vieillissement extrinsèque correspond à l'impact de l'environnement sur la peau. La cause principale de ce vieillissement est les rayonnements ultraviolets (UV), on parle de photo-vieillesse.

Le vieillissement photo-induit regroupe l'ensemble des phénomènes de sénescence cellulaire et de dégradation des protéines. Ces phénomènes sont exacerbés au niveau des membres en contact avec le soleil. Ce type de vieillissement, particulièrement important au niveau du visage, entraîne une augmentation de la couche épidermique ainsi qu'une augmentation non homogène de la pigmentation cutanée. Il se caractérise par l'élastose. Cette dernière est un défaut de la matrice extracellulaire du derme lié à la synthèse anormale des collagènes. D'où un derme rigide qui se fripe en entraînant l'apparition de rides profondes. Ces altérations des structures, des fonctions et de l'apparence de la peau sont dues à la libération de radicaux libres oxygénés et à la surexpression et suractivation des MMPs.

La composante UV du spectre solaire est formé de trois catégories : les UVA (320 à 400 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVC (100 à 280 nm). La totalité des UVC et une grande partie des UVB sont absorbés par la couche d'ozone stratosphérique. Par contre les UVA ne sont pas affectés (Frederick *et al* 1989). Ainsi, la lumière solaire atteignant la surface terrestre est composée d'environ 0,3% d'UVB, 5,1% d'UVA, 62,7% de la lumière visible et 31,9% de lumière infrarouge (Piver 1991). Par conséquent, l'homme reçoit une quantité beaucoup plus importante d'UVA que d'UVB.

Les UVA peuvent pénétrer jusque dans le derme profond où ils provoquent un stress oxydatif par des réactions de photosensibilité. Les UVB par contre pénètrent dans le derme supérieur où en plus du stress oxydatif, ils causent des dommages directs à l'ADN (Svobodova *et al* 2006, Trautiger 2001). Les UVC sont normalement arrêtés par la couche d'ozone mais en cas de contact avec la peau, ils sont stoppés au niveau de l'épiderme et y provoquent des dommages directs à l'ADN (figure-8).

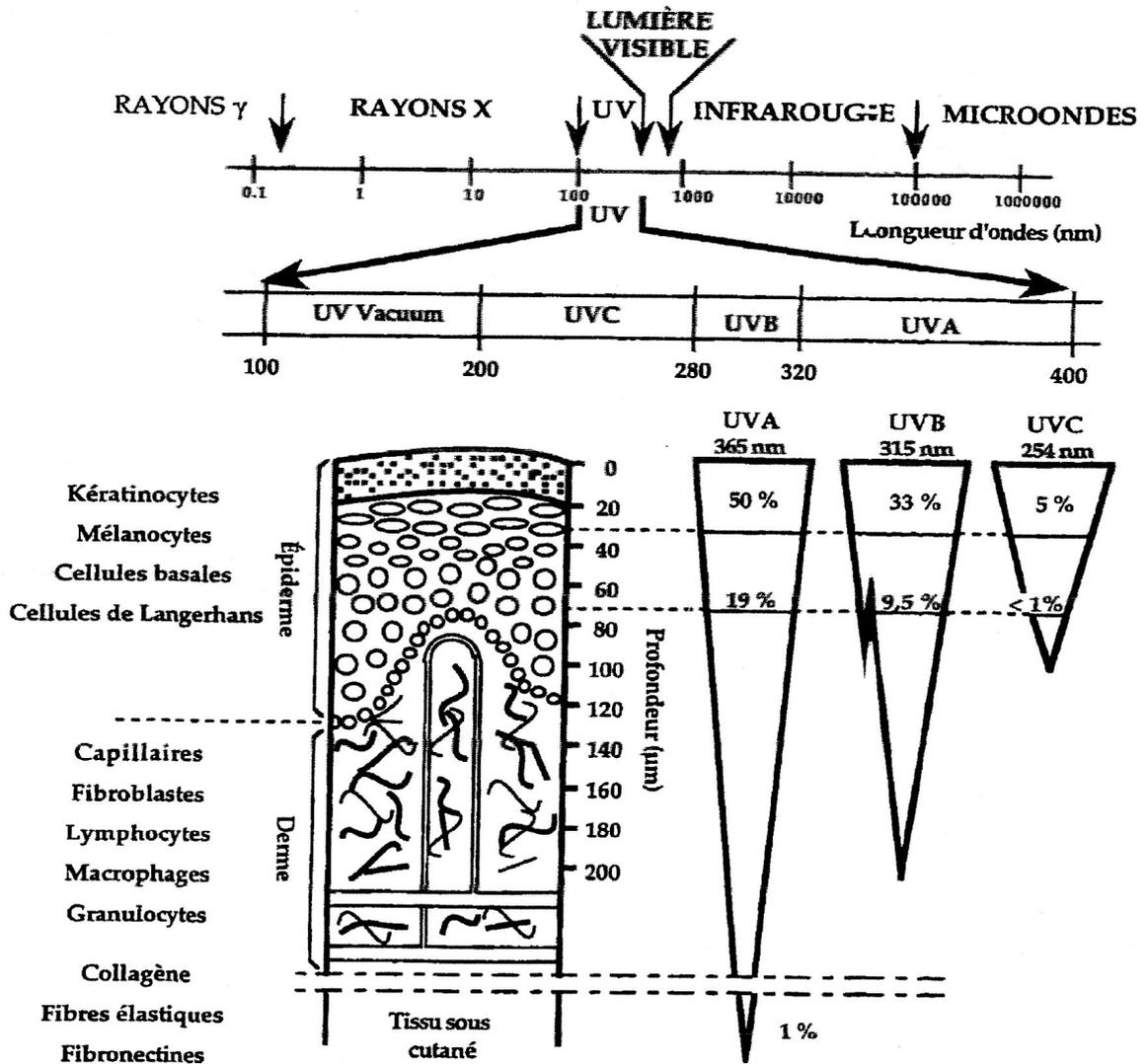


Figure-8: Les UV et leur pénétration dans la peau (Soehnege H et al 1997).

Références :

- Baramova, E. N., Bajjou, K., Remacle, A., L'Hoir, C., Krell, H. W., Weidle, U. H., Noel, A., Foidart, J. M (1997). Involvement of PA / plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Letters* **405**, 157-162.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F (1998). *Handbook of proteolytic enzyme*. Academic Press.
- Basbaum, C. B., Werb, Z (1996). Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular degradation at the cell surface. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 731-738.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., Stocler, B. R (1993). Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinase exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins. *FEBS letters* **331**, 134-140.
- Brew, K., Dinakarandian, D., Nagase, H (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**, 267-283.
- Cooper, D. N., Krawczak, M (1997). Plasminogen and its deficiency. In: *Venous thrombosis : from genes to clinical medicine*. ed by Cooper D.N., Krawczak M. Oxford : BIOS Scientific Publishers, 145-156.
- Duca, L., Floquet, N., Alix, A. J. P., Haye, B., Debelle, L (2004). Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* **49(3)**, 235-244
- Ellis, V., Scully, M. F., Kakkar, V. V (1987). Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation. A kinetic study. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 14998- 15003.
- Emonard, H. P., Remacle, A. G., Noel, A. C., Grimaud, J. A., Stetler-Stevenson, W. G., Foidart, J. M (1992). Tumor cell surface associated binding site for the M(r) 72,000 type IV collagene. *Cancer Research* **52**, 5845-5848.
- Estreicher, A., Wohlwend, A., Belin, D., Schleuning, W. D., Vassalli, J. D (1989). Characterization of the cellular binding sites for the urokinase-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 1180-1189.
- Farina, A. R., Tacconelli, A., Teti, A., Gulino, A., Macka, A. R (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 protection of matrix metalloproteinase-2 from degradation by plasmin is reversed by divalent cation chelator EDTA and the bisphosphonate alendronate. *Cancer Research* **58**, 2957-2960.
- Frederick, J. E., Snell, H. E., Haywood, E. K (1989). Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochem Photobiol* **50**, 443-450.

- Fridman, R., Toh, M., Pena, P., Mobashery, S (1995). Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Research* **55**, 3548-2555.
- Gallo, R., Kim, C., Kokenyesi, R., Adzick, N. S, Bernfield, M (1996). Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J Invest Dermatol* **107**, 676-683.
- Gething, M. J., Adler, B., Boose, J. A., Gerard, R. D., Madison, E. L., McGookey, D., Meidell, R. S., Roman, L. M., Sambrook, J (1988). Variants of human tissue-type plasminogen activator that lack specific structural domains of the heavy chain. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.)* **7**, 2731-2740.
- Gomez, D. E., Alonsa, D. F., Thorgeirsson, U. P (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinase: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology* **74**, 111-122.
- Grosshans, E (1997). Histologie de la peau normale In *Encycl Med Chir. Paris, Fasc.*
- Hajjar, K. A., Hamel, N. M (1990). Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2908-2916.
- He, C. S., Wilhelm, S. M., Pentlan, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Goldberg, G. I (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proceedings of the National Acadademy of Science* **86**, 2632-2636.
- Huet, E (2001). Contrôle des cascades protéolytiques (système plasminogène/plasmine et métalloprotéinases matricielles) impliquées dans la progression tumorale: stimulation par les peptides d'élastine et inhibition par l'acide oléique. Thèse de doctorat. Université de Reims.
- Jenkins, G (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Der* **123 (7)**, 801-810.
- Johansson, S (1996). Non-collagenous matrix proteins. In: *Extracellular matrix, molecular components and interactions*. Dir. Comper W. Amsterdam: Harwood : 68-94.
- Kinoshita, T., Sato, H., Okada, A., Ohuchi, E., Imai, K., Okada, Y., Seiki, M (1998). TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 16098-16103.
- Knauper, V., Will, H., Loper-Otin, C., Smith, B., Atkinson, J., Stanton, H., Hembery, R. M., Murphy, G (1996). Cellular mechanisms for human procollagenase 3 (MMP-13) activation. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1715-1731.
- Kobayashi, H. M., Schmitt, L., Goretzki, N., Chucholowski, J., Calvete, M., Kramer, W. A., Gunzler, F., Janicke Graeff, H (1991). Cathepsin B efficiently activates the soluble and the

tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *Journal of Biological Chemistry* **266**, 5147-5152.

-Koklitis, P. A., Murphy, G., Sutton, C., Angal, S (1991). Purification of recombinant human prostomelysin. Studies on hoat activation to give high-Mr and low-Mr active forms and a comparaison of recombinant with structural stromelysin activities. *Biochemical Journal* **276**, 217-221.

-Melissopoulo,. A., Levacher, C (1998). *La peau, structure et physiologie*. Cachan : Edition médicales internationales

-Murphy, G., Crable, T (1995). Gelatinases A and B. *Methods in Enzymology* **248**, 470-484.

-Nagase, H (1995). Human stromelysin 1 and 2. *Methods in Enzymology* **248**, 449-470.

-Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., Matrisian, L. M (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* **18**, 1135-1149.

-Okada, Y., Nakashi, I (1989). Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase) by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS letters*: 353-356.

-Okada, Y (1988). The precursor of metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and mechanism of activation by endopeptidases and 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochemical Journal* **254**, 731-741.

-Okumura, Y., Sato, H., Seiki, M., Kido, H (1997). Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS Letters* **402**, 181-184.

-Overall, C. M., Wrama, J. L., Sodek, J (1991). Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72 KDa gelatin/ type IV collagene by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparaison with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 14064-14071.

-Overall, C. M (2004). Matrix metalloproteinase substrat binding domains, molecules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods in Molecular Biology* 151: 79-120.

-Parsons. SL, Watson. SA, Brown. PD, Collins. HM, Steele. RJ 1997. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* **84**, 160-166.

-Petersen, L. C., Lund, L. R., Nielsen S., Dano, K., Skriver, L (1988). One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 11189-11195.

-Piver, W. T (1991). Global atmospherique changes. *Environ Health Perspect* **96**, 131-7.

- Plow, E. F., Miles, L. A (1990). Plasminogen receptors in the mediation of pericellular proteolysis. *Cell Differentiation and Development* **32**, 293-298.
- Puente, S. X., Pendas, A. M., Llano, E., Velasco, G., Lopez-Otin, C (1989). Molecular cloning for a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Research* **56**, 944-949.
- Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L., Quingley, J (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* **274**, 13066-13076.
- Ricard-Blum, S., Ruggiero, F (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol* **53(7)**, 430-442.
- Rice, A., Band, M. J (1995). Neutrophil elastase processing of gelatinase A is a mediated by extracellular matrix. *Biochemistry* **34**, 9249-9256.
- Rijken, D. C., Otter, M., Kuiper, J., Van Berke, T. J (1990). Receptor mediated endocytosis of tissue-type plasminogen activator (t-PA) by liver cells. *Thromb Res* **10**, 63-71.
- Rittie, L., Fisher, G. J (2002). UV-light-induced signal cascade and skin ageing. *Ageing Res Rev* **1 (4)**, 705-720.
- Robinet, A., Fahem, A., Cauchard, J. H., Huet, E., Vincent, L., Lorimier, S., Antonicelli, F., Soria, C., Crepin, M., Hornebeck, W., Bellon, G (2005). Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through up regulation of MT1-MMP. *J Cell Sci* **118**, 343-356.
- Rouvière, H., Deimas, A (1994). *Anatomie humaine*. Edition Masson. Paris (5^{ème} édition) p29.
- Sato, H., Kinoshita, T., Nakeyama, K., Seiki, M (1996). Activation of recombinant membrane with tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-2. *FEBS letters* **393**, 101-104.
- Sato, H., Takino, T., Cao, J., Shinagaw, A., Yamamoto, E., Seiki, M (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* **370**, 61-65.
- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Kuhr, L., Meewes, C., Wlaschek, M (2000). Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* **35**, 307-16.
- Seiffert, D., Mimuro, J., Schleef, R. R, Loskutoff, D. J (1990). Interactions between type I plasminogen activator inhibitor, extracellular matrix and vitronectin. *Cell Differentiation and Development* **32**, 287-292.
- Shaw, G., Kamen, R (1986). A conserved au sequence from 3'intranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **266**, 659-667.

- Soehnege, H., Ouhtit, A., Ananthaswamy, O. N (1997). Mechanism of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosc* 2 D: 538-D551.
- Sternlicht, M. D., Lochter, A., Sympton, C. J., Huey, B., Rongier, J. P., Gray, J. W., Pinkel, D., Bissel, M. J., Werb, Z (1999). The stromal proteinase MMP-3 / stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* **98**, 137-146.
- Sternlicht, M. D., Werb, Z (2001). How matrix metalloproteinase regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**, 463-516.
- Strickland, D. K., Kounnas, M. Z., Argraves, W. S (1995). LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J* **9**, 890-898.
- Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Palacky olomanc Czech Rep* **150**, 25-38.
- Takino, T., Sato, H., Shinawa, A., Seiki, M (1995). Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 23013-23020.
- Trautinger, F (2001). Mechanisms of photodamage of the skin and functional consequence of skin ageing. *Clin Exp Dermatol* **26**, 573-7.
- Vassalli, J. D., Sappino, A. P., Belin, D (1991). The plasminogen Activator / Plasmin System. *J Clin Invest* **88**, 1067-1072.
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Kronberger, A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Bauer, E. A., Golberg, G. I (1987). Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proceedings of the National Acadademy of Science* **84**, 6725-6729.
- Wiman, B., Collen, D (1977). Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma. *European Journal of Biochemistry* **78**, 19-26.
- Woessmer, J. F., Nagase, H (2000). *Matrix metalloproteinase and TIMPs*. Oxford : Oxford University Press.

Chapitre-III :

Les flavonoïdes

III-1-Introduction:

La propolis est considérée par Challem comme un type de flavonoïdes auxquels on attribue plusieurs propriétés thérapeutiques. Pour ces raisons, il nous semble utile de donner une présentation générale de ces composés sur deux plans, l'un biologique et l'autre chimique.

Les flavonoïdes (du latin , flavus : jaune) sont des pigments jaunes très répandus chez les végétaux. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bruneton 1993). Ces composés constituent l'un des plus grand groupe de phénols, et sont des constituants caractéristiques des plantes vertes à l'exception des algues. Ils sont synthétisés au niveau du chloroplaste à partir de cinnamoyl COA provenant du reticulum endoplasmique et des malonates, combinés sous forme d'hétérosides. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (Markham 1982, Reinhold *et al* 1980).

III-2-Structure chimique et classification :

L'étude des flavonoïdes suscite un grand intérêt, du fait de leur diversité structurale. Ces substances issues du métabolisme secondaire, font partie de ce qu'on appelle les micromolécules du fait de leur petit poids moléculaire et de leur accumulation en quantité extrêmement faible (quelques dizaines de ppm* le plus souvent).

Les flavonoïdes sont caractérisés par une structure commune en $C_6 - C_3 - C_6$, dans laquelle deux cycles benzéniques A et B sont réunis par une chaîne de trois carbones (Fig- 9) (Harborne 1964, Ikan 1991). La variation du degré d'oxydation de cette chaîne détermine les différentes classes de flavonoïdes (Markham 1982) représentées dans le tableau 2.

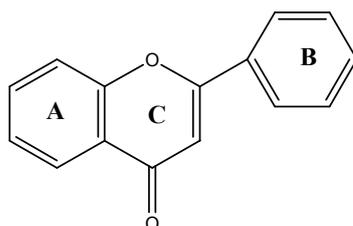


Figure-9 : Phenyl-2- chromone.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C_3 intermédiaire.

* : parties par millions

Tableau-2 : Les différentes classes des flavonoïdes.

DIFFERENTES CLASSES		PRINCIPALES SUBSTANCES	
STRUCTURE	NOM DE FAMILLE	HYDROXYLATION	NOM
	R = H FLAVONE	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apeginine Luteoline
	R = OH FLAVONOL	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Kacmpferol Quercetine
	R = H FLAVANONE (Dihydroflavone)	5, 7, 4' 7, 3', 4'	Naringenine Butine
	R = OH FLAVANONOL (Dihydroflavonol)	7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Fustine Taxifoline
	R = H CATECHINE (Flavanol-3)	5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'	Gallocatechine Catechine
	R = OH LEUCOANTHOCYANIDINE (Flavandiol-3,4)	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'	Leucocyanidine Leucodelphénédine
	R = H FLAVYLUM (Anthocyane)	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigenidine Luteolidine
	R = OH ANTHOCYANIDINE	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'	Cyanidine Delphinidine
	ISOFLAVONE	7, 4' 5, 7, 3', 4'	Daidzein Orobol
	CHALCONE	2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4	Buteine Okanine
	DIHYDROCHALCONE	4, 2', 4', 6' 3, 4, 2', 4', 6'	Phloretine Hydroxyphloretine
	AURONE	6, 3', 4' 6, 7, 3', 4'	Sulphuretine Maritimetine

III-3-Les flavonoïdes communs :

Les flavonoïdes existent généralement dans la nature sous forme d'hétérosides. Ces derniers sont des métabolites secondaires et ont pour origine des produits du métabolisme des glucides, lipides, protéines et acides nucléiques qui constituent le métabolisme primaire (Fig - 10) (Merghem 2001).

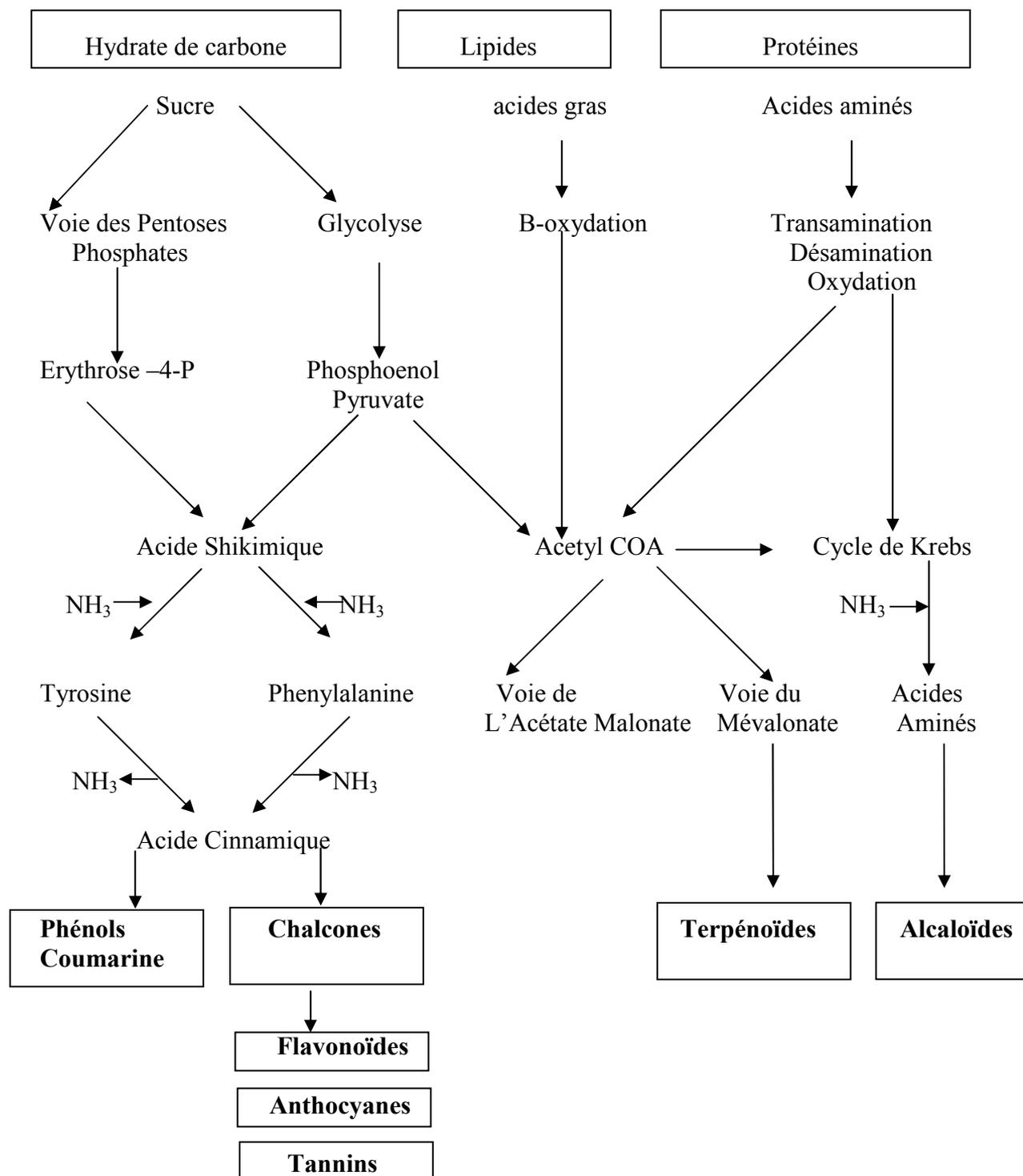


Figure-10 : Relation entre métabolisme primaire et secondaire (Merghem 2001)

III-3-a- Les aglycones :

Ces molécules sont généralement toxiques et peu solubles. Par leur combinaison avec les sucres, ils sont détoxifiés et solubilisés (Bruneton 1996).

III-3-b- Les hétérosides :

Ils résultent de la combinaison du groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique : l'aglycone ou la génine, avec élimination d'eau. La nature des hétérosides est très diverse, tant en raison du mode de liaison entre la génine et le (s) ose (s), que la structure des génines et de celle de la partie glucidique (Bruneton 1996).

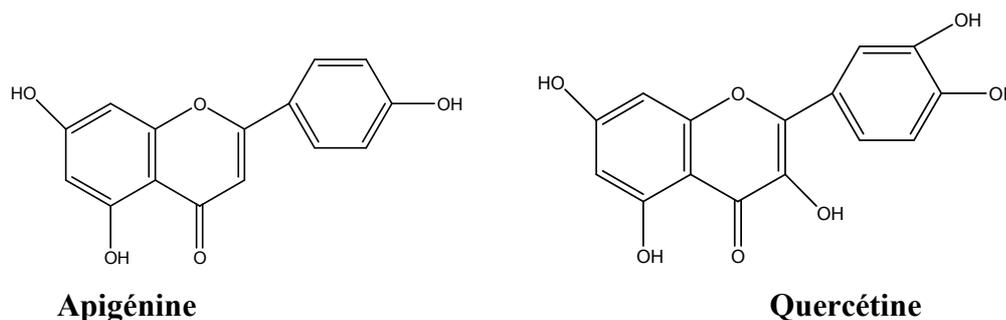
III-3-1- Les flavonoïdes O-substitués :

Les différents processus de substitution intervenant pour l'élaboration du squelette flavonique sont à l'origine de l'extraordinaire diversité structurale flavonique. Le nombre et la position des substituants sur l'aglycone sont subordonnés au fonctionnement des systèmes enzymatiques.

III-3-1-a- l'hydroxylation :

Les hydroxyles originaux en position 5, 7, 4' sont introduits avant la formation de la molécule en C₁₅ des flavonoïdes provenant de la combinaison des voies shikimate et malonate. Tandis que les hydroxyles en position 6, 8, 3' (extra hydroxyles) sont introduits après la formation de la molécule (Harborne 1973).

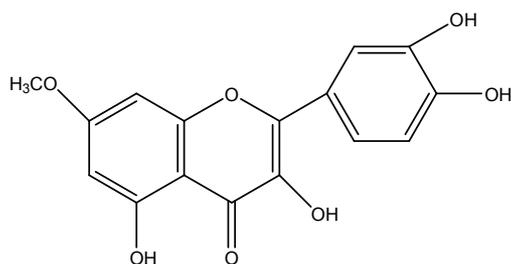
Exemples :



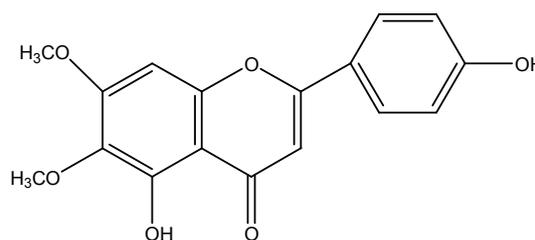
III-3-1-b- La O- méthylation :

C'est la méthylation des groupements OH originels ou extrahydroxyles. Cette réaction est catalysée par la O-méthyl transférase en présence de S-Adenosyl-Méthionine , source du groupement méthyle (De Luca et Ibrahim 1985).

Exemples :



Rhamnétine



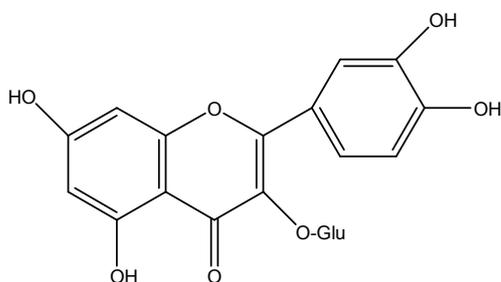
Circimaritine

III-3-1-c- La O – glycosylation :

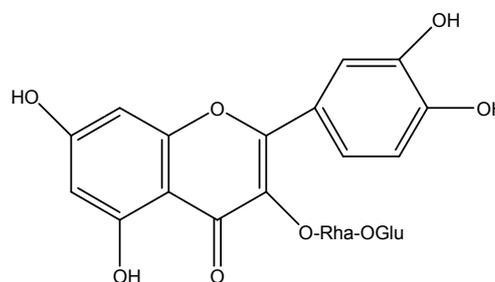
La glycosylation représente le stade terminal le plus répandu de la biosynthèse flavonique. Elle constitue un processus destiné à rendre la molécule flavonique moins réactive, d'une part, et plus soluble dans l'eau d'autre part. Cette dernière propriété lui permet d'être stockée dans le compartiment vacuolaire de la plante (Markham 1982). Les sucres qui interviennent dans la structure des hétérosides phénoliques sont presque exclusivement des aldoses. Le groupement osidique peut être mono, di ou trisaccharidique. La partie osidique est formée avec le D- glucose, le D- galactose, mais aussi avec des pentoses (L- arabinose, L- rhamnose, D-xylose) ou avec l'acide D-gluconique et D-galacturonique. La variabilité structurale augmente avec les hétérosides dont la partie osidique est un di ou trisaccharide qui peut, être en plus, linéaire ou ramifié.

Dans le cas de O-glycosylation, la liaison s'effectue entre un OH phénolique et un OH alcoolique d'un sucre. Elle peut se faire par n'importe quel hydroxyle phénolique mais, en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyl en C-7 des flavones et l'hydroxyle en C-3 des flavonols qui sont impliqués (Bruneton 1993).

Exemples :



Isoquercétine



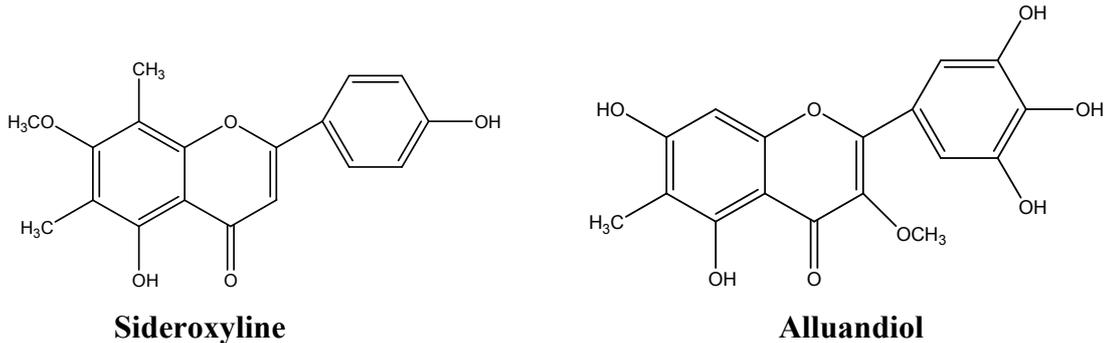
Rutine

III-3-2- Les flavonoïdes C-substitués :

III-3-2-a- La C-méthylation :

Le radical méthyle se lie au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. La C-méthylation se fait habituellement en C-6 et / ou C-8, parfois en d'autres positions (C-3 et C-7) (Wollenweber et Jay 1988, Bruneton 1993).

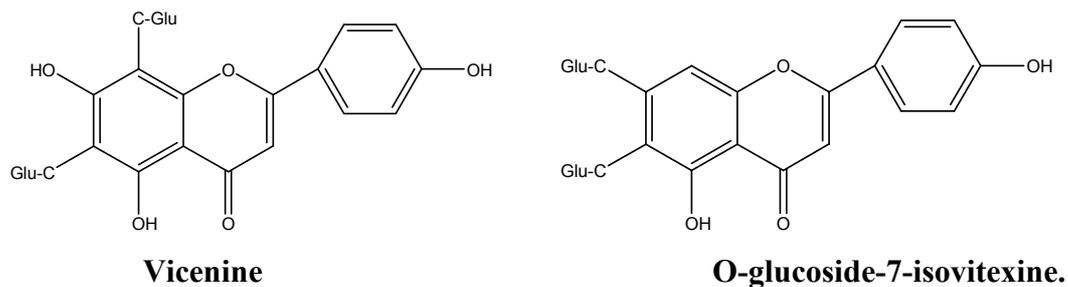
Exemples :



III-3-2-b- La C-glycosylation :

Chez les végétaux, la C-glycosylation est un mode de substitution moins fréquent que la O-glycosylation. Les C-glycosylations ont une structure particulière, les plus répandues dans la nature sont les dihydroxy-5,7, di-C-6,8 glycosylflavones dans lesquels les sucres se trouvent fixés sur le squelette flavonique en position 6 et/ou 8 (Lardy *et al* 1984). On connaît des C-glycosyl-flavonoïdes qui sont aussi C-glycosylés en position 7 ou en 4'.

Exemples :



III-4-Biosynthèse des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont issus de deux voies complémentaires.

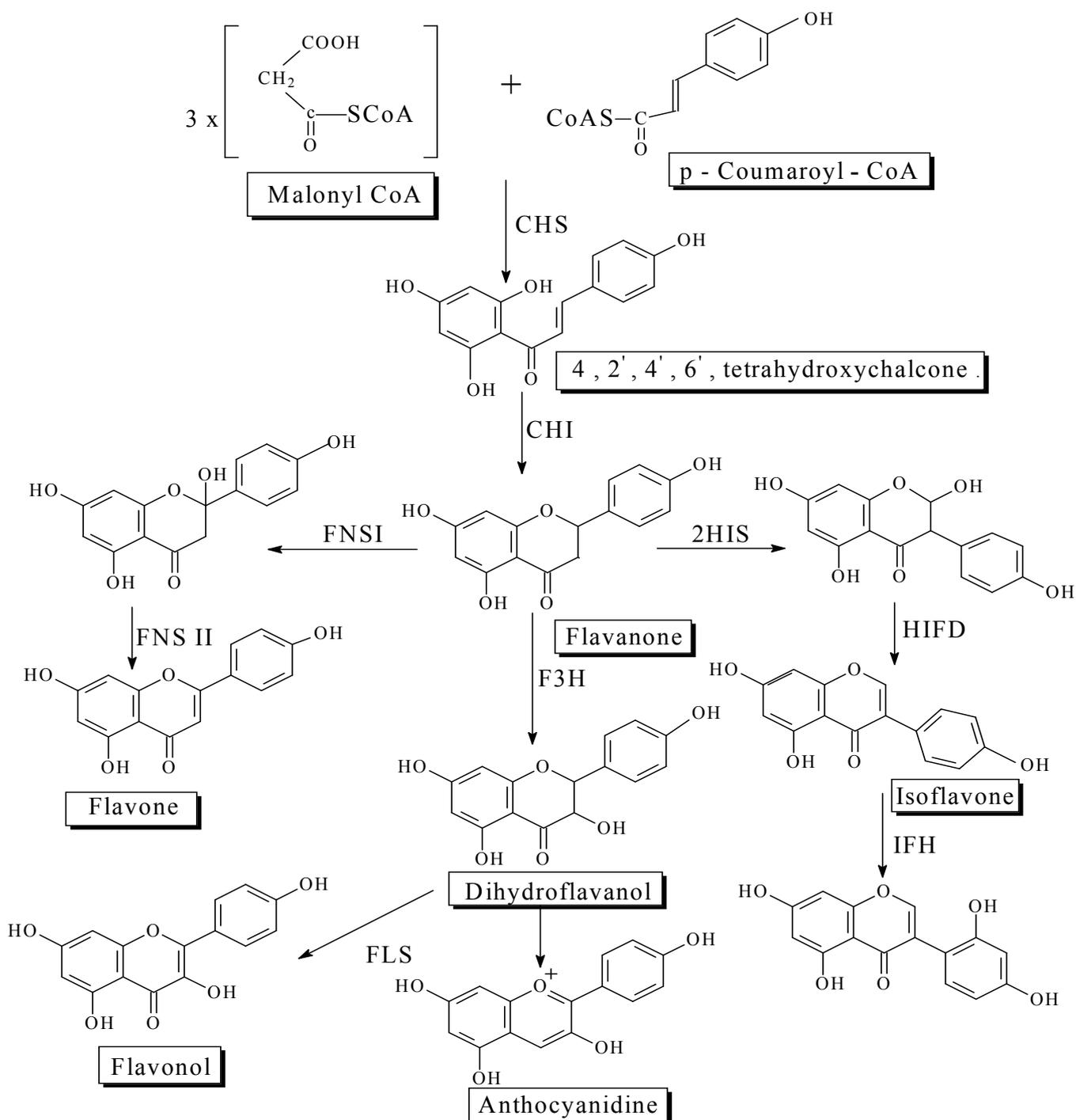
- La voie de l'acide malonique : elle constitue la voie de synthèse du noyau A qui résulte de la condensation d'une unité phényl propanoïde (para-coumaroyl COA en C₆ – C₃) avec trois unités malonyl–COA.

➤ La voie de l'acide shikimique : elle constitue la plus importante voie de synthèse du noyau benzénique par la voie de la phénylalanine. L'acide shikimique, la phénylalanine et le composé P coumarique sont les meilleurs précurseurs de cette voie.

Ainsi, comme le montre la figure-11 qui illustre la biosynthèse des flavonoïdes, l'acide shikimique conduit aux dérivés (C₆-C₃) sous l'action de deux enzymes : la **Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL)**, la **Tyrosine Ammonia-Lyase (TAL)** et forme donc le noyau B et l'hétérocycle des flavonoïdes (Haslam 1993).

Les deux voies shikimate et malonate se croisent dans la réaction de condensation de l'acide hydroxycinnamique COA avec trois molécules de malonyl COA, et forment la chalcone, considérée comme la structure de base en C-15 des flavonoïdes. C'est à partir de cette molécule que plusieurs voies divergentes conduisant ainsi aux différentes classes d'aglycones flavoniques.

Les isoflavones résultent de la transposition du noyau B des flavones correspondants. A partir d'un second carrefour métabolique important des dihydro-flavonols, deux grandes classes de flavonoïdes sont synthétisées : les flavonols et les anthocyanes, la biogenèse de ces dernières fait intervenir comme intermédiaire les flavones -3,4 diols (Harborne and Mabry 1988).



Enzymes : CHS : Chalcone synthase. CHI : Chalcone Isomérase. FNS I : Flavone synthase I. FNS II : Flavone synthase II. FLS : Flavonol synthase . HIFD : 2 – Hydroxy isoflavanone déshydratase. IFH : Isoflavone 2' hydroxylase . 2 HIS : 2 – hydroxy isoflavanone synthase . F3H : (2S) flavanone –3 – hydroxylase .

Figure-11: Biosynthèse des flavonoïdes .

III-5-Distribution et localisation:

Les flavonoïdes sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois (Markham 1982). Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes.

Les flavonoïdes existent sous forme de combinaisons, les plus fréquentes sont les hétérosides qui se trouvent principalement dans les vacuoles. Alors que leurs aglycones sont présents dans les zones lipophiles. Quant au aglycone O-méthylés on les trouve dans le cytoplasme (Harborne and Mabry 1988). Quelques flavonoïdes ont été trouvés chez les animaux : les glandes de l'odorat du castor et les ailes de papillon (Markham 1982).

III-6- Intérêt des flavonoïdes :

Les molécules flavoniques possèdent des caractéristiques particulières qui font d'elles des marqueurs de choix dans l'étude et la compréhension de l'organisation hiérarchique du monde végétal. D'une part, ce sont des métabolites secondaires chimiquement stables, ce qui facilite énormément l'accès analytique. D'autre part, ils présentent une extraordinaire diversité structurale (Gonnet 1989).

III-6-1- Intérêts biologiques :

Les flavonoïdes sont, avec les chlorophylles et les caroténoïdes, les principaux facteurs de coloration des plantes. Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-oranger au bleu, en passant par le pourpre et le rouge. Les flavones, aurones et chalcones donnent plutôt des couleurs jaunes, beiges voire blanches, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et caroténoïdes. Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes afin de déclencher la fécondation et de charger ces insectes de pollen ou de graines de façon à assurer la dissémination nécessaire à la reproduction de l'espèce (Harborne et Grayer 1993).

Si tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine visible, ils présentent tous une bande dans l'ultraviolet proche du visible. Certains insectes (les abeilles) distinguent les fréquences de radiation dans le domaine ultraviolet et visible et montrent des préférences pour le bleu et le jaune (Harborne et al 1975). C'est pourquoi, la possibilité de changement de couleur est largement utilisée par les plantes pour assurer la survie de l'espèce. Les flavonoïdes, par leur goût désagréable, repoussent certains insectes et jouent également un

rôle dans la protection de ces plantes. L'accumulation des flavonoïdes aglycones sur les pellicules superficielles des tiges et des feuilles jouent un rôle de photoprotection contre les rayons UV-B de la lumière solaire, pour lesquels les flavonoïdes forment un écran filtrant au bénéfice des acides nucléiques en particulier (Gonnet 1989, Guignard et al 1985). Les flavonoïdes, qui imprègnent le bois de cœur, ont des propriétés fongicides, bactéricides (Reinhold et al 1980) et insecticides (Rees et Harborne 1985) et protègent l'arbre contre l'intrusion des champignons ou des insectes.

III-6-2- Intérêts pharmacologiques :

Ce n'est que depuis quelques années que certaines propriétés pharmacologiques ont pu être mises en évidence. Leur étude a alors pris un nouvel essor (Sakagami et al 1995). Les techniques modernes d'isolement de molécules et d'exploitation médicale montrent que beaucoup de propriétés thérapeutiques reposent sur les produits du métabolisme secondaire. De plus, il existe une relation directe entre les propriétés physico-chimiques de ces composés et leur activité biologique et/ou pharmacologique.

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être veino-actifs (Bruneton 1993, Paris et Hurabielle 1981), c'est à dire capable de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et renforcer leur résistance. Les flavonoïdes sont aussi des piègeurs de radicaux libres (Pratt Dan 1990, Torel et al 1986). Biochimiquement, les radicaux libres seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et de mutations, d'initiation et de promotion du processus de cancérisation, ainsi que de dégradations cellulaires du fait de leur réaction avec les phospholipides membranaires (Bruneton 1993).

Les propriétés antioxydantes des flavonoides sont étroitement liées à leur structure phénolique, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques. Des études de relation structure-activité mettent en évidence la contribution importante des groupements OH phénoliques (Lien et al 1999, Yokosawa et al 1998) particulièrement ceux situés en position C-3 du cycle C, C-3' et C-4' du cycle B, C-5 du cycle A (Van Acker et al 1996). Par ailleurs, la présence dans le cycle C d'une double liaison stabilisatrice en position 2, 3-conjuguée avec la fraction 4-céto, confère à ces composés une plus grande activité antioxydante (Sim et al 2007, Rice-Evans et al 1996).

Selon BRUNETON, les flavonoïdes sont, in vitro, des inhibiteurs enzymatiques :

- Inhibition de la hyaluronidase, par les flavones et surtout les proanthocyanidols, permettant ainsi la conservation intégrale de la substance fondamentale de la gaine vasculaire.
- Inhibition non spécifique de la catéchol-O-méthyle transférase, entraînant une augmentation de la disponibilité des cathécolamines ce qui provoquerait une élévation de la résistance vasculaire.
- Inhibition de la phosphodiésterase de l'AMPc, ce qui pourrait expliquer leur activité anti-agrégat plaquettaire.
- Inhibition de l'aldose-réductase ce qui explique la pathogénie de la cataracte.
- Plusieurs flavonoïdes (cirsibiol, hyalocline...) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase et donc de la production des leucotriènes médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques. D'autres flavonoïdes (lutéoline, apigénine, chrysin...) inhibent la cyclooxygénase et l'agrégation plaquettaire.

Ces propriétés démontrées in vitro, pourraient expliquer en partie les activités anti-inflammatoires et antiallergiques. Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique. C'est le cas de la proline-hydroxylase.

□ Les flavonoïdes possèdent aussi des propriétés :

- Hépatoprotectrices.
- Antispasmodiques sur l'iléon de cobaye stimulé par divers agonistes
- Hypocholestérolémiantes (Bruneton 1993).
- Diurétiques (Bruneton 1993, Paris et Hurabielle 1981).
- Antibactériennes (Jiménez et al 1999, Mori et al 1987), antivirales in vitro (Sakagami et al 1995).
- Anticancérogènes et inhibitrices de la croissance des cellules tumorales in vitro (Bruneton 1993, Mori et al 1987).

III-7- Méthode d'étude structurale des flavonoïdes :

Les techniques couramment utilisées pour la détermination de la structure des composés flavoniques sont :

- Spectrométrie UV-visible.
- Spectrométrie de masse.
- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

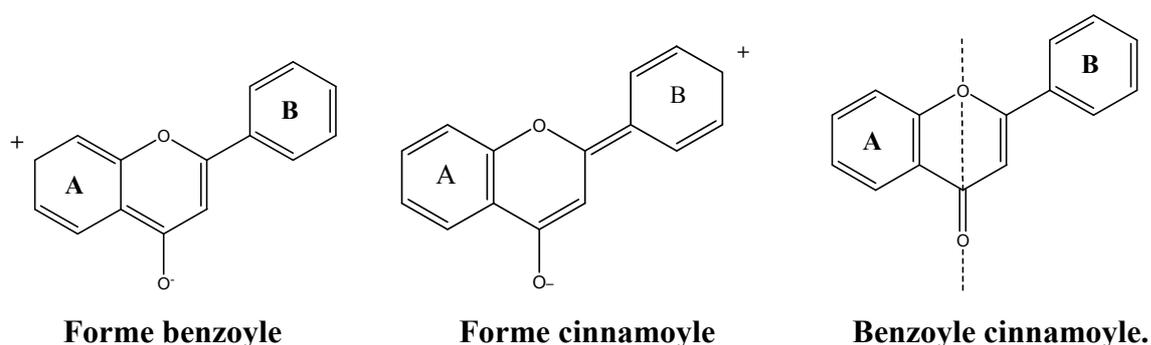
III-7-1- Spectrométrie UV-visible :

La spectrométrie UV-visible est une technique essentielle dans l'identification des flavonoïdes. C'est une méthode très sensible et très peu exigeante (elle n'exige que peu de produit). Les spectres sont réalisés en trois séries de trois étapes. Ils sont réalisés par défilement des longueurs d'onde de 230 nm à 460 nm.

L'analyse des différents spectres enregistrés apporte les premières indications sur la structure des flavonoïdes. En se basant sur le déplacement des bandes dans les différents réactifs par rapport aux bandes du spectre méthanolique une première structure est envisagée (type du squelette, position et mode de substitution).

-Absorption en milieu méthanolique neutre :

Dans le méthanol les composés flavoniques présentent un spectre d'absorption entre 250 et 385 nm. La bande I se trouve entre 300 et 385 nm. Cette bande correspond à l'absorption du système cinnamoyle qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B. La bande II est comprise entre 250 et 280 nm. Cette bande est associée à l'absorption du système benzoyle du noyau A et permet de connaître le nombre substituant du noyau A (Jurd et Horowitz 1982, Harborne 1964).



-Une monosubstitution en 4' se traduit par une bande unique vers 270 nm.

-Une ortho substitution fait apparaître deux bandes ou une bande et une inflexion.

-Une trisubstitution est caractérisée par une seule bande et située entre 250 et 270 nm (Mabry *et al* 1970).

La substitution du noyau A, en général dihydroxylé en 5 et en 7, entraîne les modifications suivantes :

-L'introduction d'un hydroxyle en C-8 produit un effet bathochrome de 13 à 16 nm de la bande I avec apparition d'un pic supplémentaire à 330 nm.

- L'introduction d'un hydroxyle en C-6 produit un effet hypsochrome de 8 à 10 nm. Cet effet est annulé par la méthylation de cet hydroxyle (Combiér *et al* 1974).

Les positions des deux bandes d'absorption dans l'UV-visible en milieu méthanolique des différents flavonoides sont représentées ci-après :

Tableau-3 : Domaine d'absorption des flavonoides sous UV-visible (Markham KR 1982).

Bande II	Bande I	Type de flavonoïde
250-280	310-350	Flavone
250-280	330-360	Flavonols (3-OH substitué)
250-280	350-385	Flavonols (3-OH libre)
245-275	310-330 épaulement Pic à 320	Isoflavone Isoflavone (5-deoxy-6,7-dioxygéné)
275-295	300-330	Flavonones et dihydroflavonols
230-270	340-390	Chalcones
230-270 Basse intensité	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanes et anthocyanidines

-Absorption en présence de réactifs :

Plusieurs réactifs sont employés dans l'identification et l'analyse structurale des flavonoides. L'action spécifique de ces réactifs permet de localiser les substituants sur le squelette de base.

➤ **NaOH :**

NaOH base forte ionise tous les hydroxyles phénoliques de la molécule et plus particulièrement les OH en position 3, 4' et 7. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important pour la bande I.

Les flavonoides très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif et cette instabilité augmente avec le nombre de substituant OH (Voirin 1983).

Ce réactif est utilisé en deux temps :

-Instantanément.

-après 5 minutes.

➤ **AlCl₃ et AlCl₃/HCl:**

Le chlorure d'aluminium possède des propriétés chélatantes vis-à-vis des flavonoides avec formation d'un complexe labile avec deux hydroxyles libres en position ortho 3',4' sur le noyau B ou 7, 8 ou 6, 7 sur le noyau A. Un autre complexe, stable dans ce cas est formé entre le carbonyle en 4 et l'hydroxyle en 5 et/ ou 3 (Voirin 1983). Il en résulte un déplacement bathochrome par rapport au spectre méthanolique. Ce déplacement s'accompagne d'un dédoublement par un effet hypsochrome causé par la décomposition des complexes orthodihydroxylés (Markham 1982).

L'interprétation des spectres nécessite deux comparaisons:

-Comparaison des spectres relevés en présence d'AlCl₃ / HCL par rapport au spectre AlCl₃.

.Comparaison des spectres relevés en présence d'AlCl₃ / HCL par rapport au spectre méthanolique.

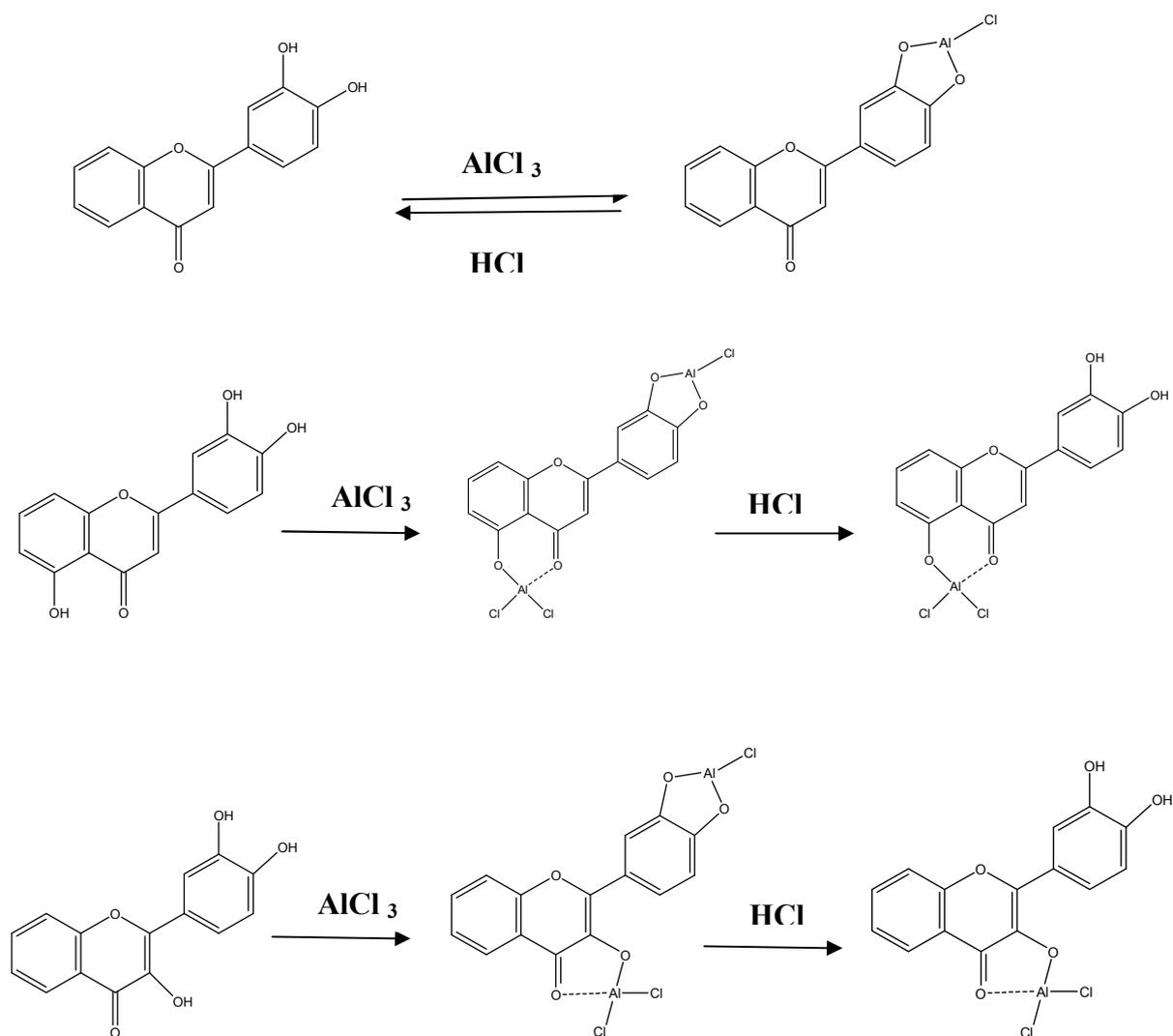


Figure-12 : Formation de complexe avec AlCl_3 et HCl .

➤ **$\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$:**

L'acétate de sodium est un sel faiblement basique qui ionise les hydroxyles les plus acides situés en 3, 4' et 7. Les autres groupements hydroxyles ne sont pas affectés. Ce réactif est utilisé pour savoir si l'hydroxyle en 7 est libre ou substitué. L'ionisation de ce groupement affecte principalement la bande II et crée un déplacement bathochrome de 5 à 20 nm par rapport au spectre MeOH neutre. Ce déplacement est réduit s'il existe un groupement OR en 6 et / ou 8 (Lespagnol *et al* 1974).

L'utilisation de l'acide borique en présence de l'acétate de sodium chélate les hydroxyles en position ortho sur le noyau B. Ce phénomène entraîne un déplacement bathochrome de 18 à 36 nm de la bande I (Jurd 1982). Ce déplacement est réduit lorsque le noyau A est orthodihydroxylé en 6, 7 ou 7, 8. Si l'un des hydroxyles est méthoxylé cet effet est annulé.

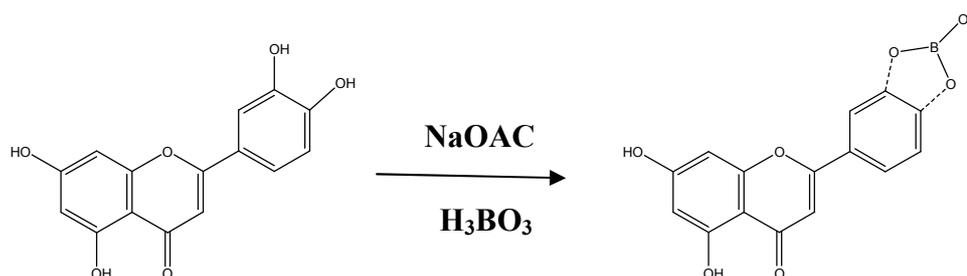


Figure-13 : Complexation de la lutéoline en présence de NaOAc.

III-7-2-La spectrométrie de masse (MS) :

La spectrométrie de masse est une technique très sensible qui permet de connaître la masse moléculaire exacte des composés flavoniques. C'est une technique de choix pour l'analyse structurale. Elle utilise de très faible quantité de produit (< 1mg) et apporte des renseignements structuraux très précis. Le choix de la technique utilisée dépend de la nature du composé flavonique. L'impact électronique est satisfaisante pour les aglycones, alors que, pour les hétérosides la FAB est indispensable.

✓ *Spectrométrie de masse à impact électronique (EI) :*

Cette technique consiste à volatiliser la molécule par chauffage sous vide et à bombarder cette vapeur par un courant d'électrons à forte énergie dont le choc sera à l'origine de la fragmentation de la molécule selon son type structural. Elle présente l'avantage de favoriser une fragmentation importante et de donner une véritable fiche d'identification de l'échantillon. Mais elle a, en contrepartie, l'inconvénient de rendre très faible le signal du pic moléculaire et de donner des spectres trop chargés (Harborne et Grayer 1993). Seuls les aglycones pourront être analysés en mode EI car les hétérosides manquent de volatilité.

• **EI-MS :**

En impact électronique, l'ion moléculaire est produit soit par capture d'un électron ($M^{\cdot-}$) ou (très probablement) par la perte d'un électron (M^+). La plupart des travaux publiés sur la SM des flavonoides concernent la SM d'ions positifs. Les flavonoides aglycones présentent des fragments caractéristiques dans leur spectre de masse EI. Les flavones et flavonols présentent généralement les fragments M^+ , $[M-H]^+$, $[M-CO]^+$, un ou plusieurs des fragments A_1^+ , $[A_1 + H]^+$, B_1^+ , B_2^+ ceux qui commencent par des ruptures Retro-Diels-Alder. En général les aglycones avec un ou plusieurs groupes méthoxyles présentent le fragment $[M-15]^+$. Ce dernier est plus intense pour les flavonoides 6 et 8 méthoxylés.

Dans les 2'-hydroxyyles on peut trouver le fragment $[M-OH]^+$, tandis que les 2'-méthoxyyles présentent le fragment $[M-OMe]^+$. Le fragment $[M-H_2O]^+$ est commun des flavonols, flavones, flavan-3,4-diols et des C-glycosides (Harborne et Grayer 1993).

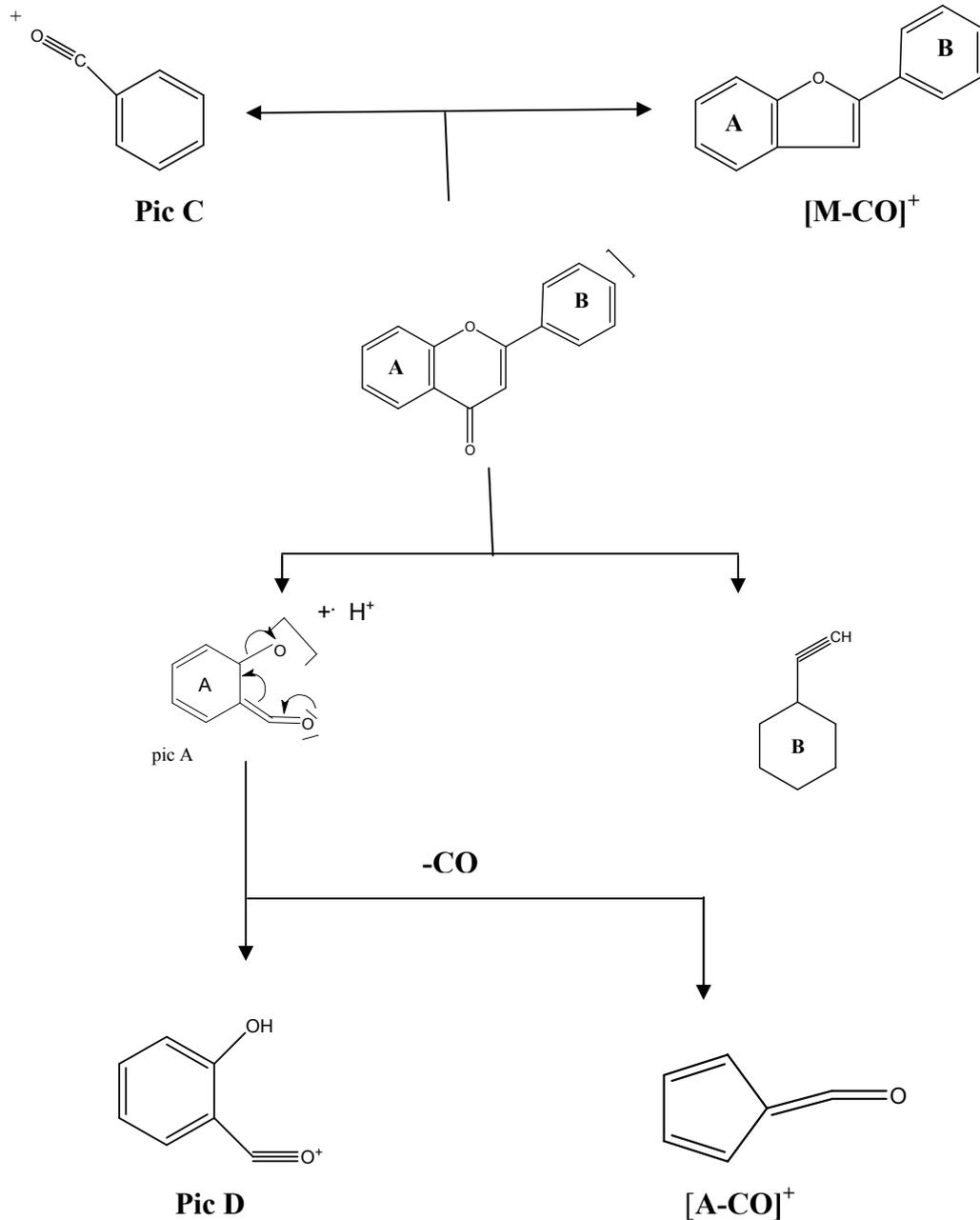


Schéma-1 : Fragmentation d'une flavone.

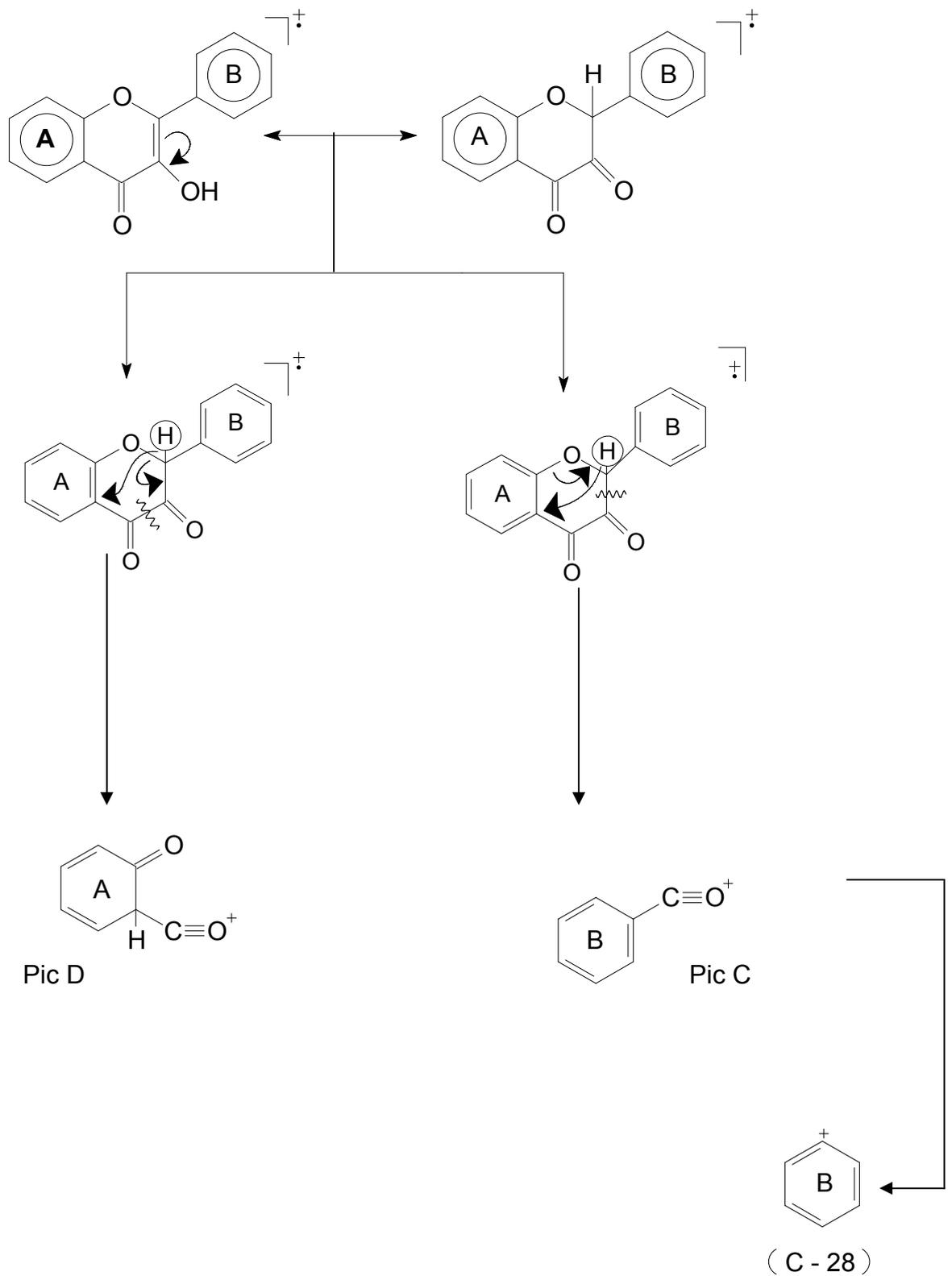


Schéma-2 : fragmentation d'un flavonol.

✓ **La spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB) :**

Cette technique permet de connaître l'ion moléculaire et la nature des sucres des molécules hétéro osidiques polaires et peu volatiles ou de poids moléculaire élevés qui ne peuvent être analysées directement en SM par impact électronique (Becchi et Fraisse 1989). Dans la grande majorité des cas, cette méthode donne des pics quasi-moléculaires MH^+ . On constate également la présence d'ions type $[M + \text{ion métallique}]$ comme $[M + Na]^+$, $[M + Ca]^+$, $[M + K]^+$etc. Le spectre contient des ions caractéristiques du produit à analyser ainsi que des fragments : $[M + H]^+$, $[M - H]^+$, $[M + Na]^+$, $[M - H + Na]^+$etc.

La méthode FAB est caractérisée par des intensités élevées et des hauteurs de pics relativement stables. Elle évite la dérivation des composés et fournit un nombre d'information limité (valeurs de la masse moléculaire et masse du sucre et de l'aglycone). Cette méthode a pour inconvénient la production d'ions additionnels dû à l'interaction avec les matériaux de la matrice ce qui peut compliquer l'interprétation du spectre (Markham 1982, Becchi et Fraisse 1989).

✓ **La spectrométrie de masse en mode électrospray (ES) :**

C'est une technique plus récente qui permet l'analyse des molécules de haute masse ainsi que les petites molécules fragiles. L'ionisation par électrospray des flavonoïdes permet d'obtenir la masse moléculaire des échantillons peu volatiles et à structure fragile telles que les O-glycosides. Les pics moléculaires obtenus sont le plus souvent sous forme d'ions quasi moléculaires $[M-H]^+$ et des fragments caractéristiques ainsi que des ions de type $[M + \text{ion métallique}]$ (Delolme et Favre-Bonvin 1992).

III-7-3- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire :

Cette technique est utilisée en dernier lieu afin de visualiser le nombre et la position des protons, des carbones et d'établir les corrélations $^1H-^{13}C$ sur les cartes bidimensionnelles (HMBC, HSQC). La RMN permet de vérifier et de confirmer les approches structurales déduites à partir des données précédentes. Cette méthode exige de plus grande quantité de produit. Cependant, l'échantillon analysé peut être récupéré après la réalisation du spectre.

• **La RMN du proton :**

Cette méthode permet :

- la localisation des protons.
- la détermination du modèle d'oxygénation.
- la détermination du nombre et de la position des groupements méthoxyles.
- la détermination du nombre, la nature et la position des sucres présents (Markham 1982, Pawan 1992).

L'exadeuterodiméthyl sulfoxide (DMSO- d_6) est le solvant de choix pour la plupart des flavonoïdes (aglycones et glycosides) (Markham 1982, Markham et Geiger 1993).

La position des signaux, leur forme traduisant les couplages entre les protons ainsi que la fréquence de la constante de ces couplages permettent de déterminer les protons de la molécule flavonique.

✓ *Les protons du noyau A :*

Le spectre d'un flavonoïde di substitué en 5 et 7 donne deux doublets résonnants aux champs 6 à 7,1 ppm et 6,3 à 6,5 ppm correspondants aux protons H-6 et H-8. Leur constante de couplage est de 2,5 Hz. La localisation de ces protons (H-6 et H-8) dépend de la nature des substituant en C-5 et C-7 (Markham et Geiger 1993).

Les déplacements chimiques des protons du noyau A sont représentés dans le tableau-4.

Tableau-4 : Données RMN- H^1 (déplacements chimiques et constantes de couplage) des protons du noyau A.

Nature du flavonoïde	H-5	H-6	H-8
5,7-OH	-	6,0-6,2 ppm (d, $J = 2,5$ Hz)	6,3-6,5 ppm (d, $J = 2,5$ Hz)
5-OH, 7-OR	-	6,2-6,4 ppm (d, $J = 2,5$ Hz)	6,5-6,9 ppm (d, $J = 2,5$ Hz)
5, 7, 8-OR (R=H, sucre)	-	6,3 ppm (s)	-
7-OR	8,0 ppm (dd, $J = 9,0$ et 2,5 Hz)	6,7-7,1 ppm (d, $J = 2,5$ Hz)	6,7-7,0 ppm (d, $J = 2,5$ Hz)

✓ *Protons du noyau B :*

Le déplacement chimique des protons du noyau B se situe entre 6,7-7,9 ppm. Ce déplacement est basé sur les substituants du noyau B et le degré d'oxydation du noyau C.

Les protons H-2', H-6' et H-3', H-5' apparaissent à 7,7-8,1 ppm et 6,5-7,1 ppm sous forme de doublet avec une constante de couplage de 8,5 Hz en cas d'une monosubstitution en C-4. Le déplacement chimique des protons du noyau B sont représentés dans le tableau-5.

Tableau-5 : Données RMN- H^1 (déplacements chimiques et constantes de couplage) des protons du noyau B.

Flavonoïdes	H-2', H-6'		H-3', H-5'	
Flavone (4'-OH)	7,7-7,9 ppm d ($J = 8,5$ Hz)		6,5-7,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz)	
Flavonol (4'-OH)	7,9-8,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz)		6,5-7,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz)	
3', 4'-di-OH	7,2-7,3 ppm d ($J = 2,5$ Hz)	7,3-7,9 ppm dd ($J = 2,5$ et $8,5$ Hz)	-	6,7-7,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz)
3',4',5'-tri-OH	6,5-7,5 ppm (s)		-	

✓ *Protons de l'hétérocycle :*

Le proton d'une flavone apparaît comme un singulet entre 6 et 7 ppm. Ce proton très souvent le signal du proton H-6 ou H-8 dans le cas d'une oxygénation en 5, 6, 7 ou 5, 7, 8.

✓ *Les protons de la partie osidique :*

Les protons de la partie osidique se situent entre 3,5 et 4 ppm. Par contre, le proton anomérique H-1' apparaît entre 4,2 et 6 ppm. L'intégration du signal, proportionnelle au nombre de protons, permet de déterminer le nombre de sucres. La constante de couplage du proton anomérique permet de déterminer l'anomère α ou β du sucre une fois sa nature déterminée (Markham et Geiger 1993).

✓ *Les protons méthoxylés :*

La présence d'un ou de plusieurs méthoxyles sur le squelette flavonique se traduit par l'apparition d'un ou de plusieurs singulets situés entre 3,5 et 4,1 ppm.

La position de ces méthoxyles sur la structure flavonique peut être déterminée par l'emploi de deux solvants différents. L'observation du déplacement du signal correspondant aux méthoxyles permet de les positionner (Mabry et al 1970).

• **La RMN du carbone :**

Cette technique donne des informations sur le squelette carbonique de la molécule par exemple :

-détermination du nombre de carbone et de leur environnement.

-identification des liaisons C- et O- sucres.

Les résonances des carbones des flavones et flavonols ont lieu entre 9 et 185 ppm (Markham 1982). Les valeurs de déplacement chimique des carbones nucléaires des flavonoïdes sont

influencées par leur densité électronique. Les carbonyles (4, C=O, acyle) résonnent à des champs faibles entre 170 ppm et 210 ppm, les carbones aromatiques oxygénés résonnent entre 130 et 165 ppm et les carbones aromatiques non oxygénés résonnent entre 90 et 135 ppm (Markham 1982). Tandis que les hydrocarbures et autres carbones aliphatiques résonnent entre 0-110 ppm. Les groupements méthoxyles et les C-méthyles résonnent entre 55-61 ppm et 16-18 ppm respectivement (Pawan 1992).

Références :

- Becchi, M., Fraisse, D (1989). Fast atom bombardement and fast atom bombardement collision activated-Dissociation / Mass-analysis ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. *Biomedical and environmental mass spectrometry* **18** , 122-130.
- Bruneton, J (1993). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Techniques et documentation*. Edition : Lavoisier (2^{ème} édition) Paris.
- Bruneton, J (1996). *Plante toxique, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. Edition LaVoisier (Paris).
- Challem, J (1995). *Medical Journal Document Value of Bee Propolis, Honey and Royal Jelly*. The nutrition reporter.
- Delolme, F., Favre-Bonvi, J (1992). Récents développements du couplage chromatographique en phase liquide, spectrométrie de masse. *Spectra* 2000 n163, 22-23.
- De Luca, V., Ibrahim, R. K (1985). Enzymatic synthesis of polymethylated flavonols in *Chrysosplenium americanum*. II-Substrate interaction and product inhibition studies of 3-, 6-, and 4'-O-methyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **238**, 606-618.
- Gonnet, J. F (1989). *Apport de la biologie micromoléculaire (flavonoïdes) à la Compréhension de la structure et du fonctionnement de l'espèce allogame *Centaureae montana* (composées)*. Thèse de doctorat d'état, Université CLAUDE-BERNARD. Lyon I.
- Guignard, J. L., Cosson, L., Henry, M (1985). *Abrégé de phytochimie*. Edition: Masson. Paris.
- Harborne, J. B (1964). *Biochemistry of phenolics compounds*. Academic press. New York.
- Harborne, J. B (1973). *Flavonoids in the phytochemistry*. Lawrence PL Ed Volume II. Litton editorial publishing (P 344).
- Harborne, J. B., Grayer, R. J (1993). *The flavonoids, Advances in research since 1986*. Edition : J.B. Harborne, Chapman and Hall. 589-618. London.
- Harborne, J. B., Mabry, T. J and Mabry, H (1975). *The flavonoids*. Edition: Chapman and Hall. London
- Haslam, E (1993). *Shikimic acid, metabolism and metabolites*. Edition: Jhn Wiley and Sons.
- Ikan, R (1991). *Natural products a laboratory guide*. Academic press. New York (2^{ème} édition).
- Jiménez, M., Garcia-Carmona, F (1999). Myricetin, an antioxidant flavonol is a substrate of polyphenol oxidase. *J Sci Food Agric* **79**, 1993-2000.

- Jurd, L., Horowitz, R (1982). Spectral properties of flavonoid compounds in the chemistry of flavonoids compounds. Pergamon Press New York.
- Lardy, C., Bouillant, M. L., Chopin, J (1984). Separation de C-glycosylflavones par chromatographie à haute performance en phase inverse. Journal of chromatography A, **291**, 307-315.
- Lespagnol, A., Cœur, A., Alarey, J., Lespagnol, C., Lesieur, D (1974). Chimie des médicaments. Tec et Doc. Paris.
- Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., Wang, R (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. Free Radi Biol Med **26**, 285-294.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York.
- Markham, K. R (1982) . Techniques of flavonoid identification. Academic press. London.
- Markham, KR , Geiger. H 1993. ¹H-Nuclear magnetic resonance spectrometry of flavonoids and their glycosides in hexadeuteriodimethyl sulfoxide In “ Flavonoids advances in research since 1986 (Harborne JB). Edition Chapman and Hall (chapitre 10): 441-473.
- Merghem, R. Origine et biogénèse des molécules d'origine naturelle, importance pour l'industrie pharmaceutique. Proceeding du 1er Séminaire national sur les substances bio actives d'origine végétale.2001 mai 7 et 8 Jijel (Algérie) p.105-111.
- Morin, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S (1987). Antibacterial activity and mode of Action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. Phytochemistry **18 (26)**, 2231-2234.
- Paris, M., Hurabielle, M (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1. Edition: Masson.
- Pawan, K. A (1992). NMR spectrometry in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry **10**, 3307-3330.
- Pratt Dan, E 1990. Natural Antioxidants Not Exploited Commercially, in Food Antioxidant. edited by Hudson. B. J.F, Elsevier Applied Science, London and New York, 176.
- Rees, S. B., Harborne, J. B (1985). The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. Phytochemistry **24**, 2225-2231.
- Reinhold, L., Harborne, J. B., Swain, T (1980). Progress in phytochemistry. Edition : Pergamon press New York.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radi Biol Med **20**, 933-956.
- Sakagami, H., Sakagami, T., Takeda, M (1995). Antiviral properties of polyphenols.

Polyphenols actualités **12**, 30-32.

-Sim, G. S., Lee, B. C., Cho, H. S., Lee, J. W., Kim, J. H., Lee, D. H., Kim, J. H., Pyo, H. B., Moon, D. C., Oh, K. W., Yun, Y. P., Hong, J. T (2007). Structure-activity relationship of antioxidative property of flavonoid in UVA-irradiated human dermal fibroblast. Arch Pharm Res **30 (3)**, 290-8.

-Torel, J., Cillard, J., Cillard, P (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry **25 (2)**, 383-385.

-Van Acker, S. A. B. E., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P, Va Der Vijgh, W. J. F., Bast, A(1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radi Biol Med **20**, 331-342.

-Voirin, B (1983). UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3', 4') or tri-(3', 4', 5')-substitutedb rings. Phytochemistry **22 (10)**, 2107-2145.

-Wollenweber, E., Jay, M (1988). Flavones and flavonols in the "flavonoids" (Harborne JB). Edition : Chapman and Hall.

-Yokosawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nanaka, G. I, Nishioka, I (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. Bioche Pharmacol **56**, 213-222.

Chapitre-IV :

Matériel et méthodes

IV- 1-Etude comparative de quelques propolis de L'est-algérien :

IV-1-1-Etude de l'activité antibactérienne :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique ainsi qu'au niveau du Laboratoire de Bactériologie du C.H.U (Centre Hospitalo-universitaire) Ibn Badis de Constantine. C'est la première étape de notre travail. Les propolis étudiées proviennent de plusieurs régions de l'Est algérien : El-Malha (Mila) (propolis 1), Benibelaid, Kaous et Jamaa (Jijel) (propolis 2, 3 et 4).

Le but de cette étude est l'évaluation de l'activité antibactérienne de nos propolis sur les streptocoques α hémolytique et non hémolytique testés pour la première fois. De plus, nous avons testé les souches de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Merseta et Meresta 1985, Robeira de Razenda et al 2006) et les souches : *Staphylococcus aureus* (Shub et al 1978, Bankova et al 1995, Grange et Davey 1990) , *Escherichia coli* (Grange et Davey 1990, Silici et al 2005), *Pseudomonas aeruginosa* (Ugur et Arslan 2004, Grange et Davey 1990), *Klebsiella pneumoniae* (Francisco A Tomas-Barberan et al 1993, Marcucci 1995, Grange et Davey 1990), *Proteus mirabilis* (Francisco A Tomas-Barberan et al 1993, Marcucci 1995, Drago et al 2000) et le streptocoque β hémolytique (Drago et al 2000, Keskin et al 2001) citées dans la littérature.

IV-1-1-1-Extraction :

L'extraction des substances bioactives de la propolis est réalisée par macération dans l'éthanol à 60%, 70%, 80% et 95% (V/V) selon la méthode de Park et Ikegaki 1998 : la propolis est additionnée de dix volumes de solvant de son poids (pour 1 g de propolis, nous ajoutons 10 ml de solvant). Le mélange est laissé pour macération pendant une semaine avec agitation de temps en temps. Après macération le mélange est chauffé (bain-marie) à 70°C pendant 30 minutes puis filtré. L'extrait obtenu est appelé Extrait Ethanolique de Propolis (EEP). Une partie de cet extrait est laissée pour l'étude du profil chimique et la réalisation de l'antibiogramme. L'autre partie est évaporée pour obtenir un extrait sec, facile à manipuler.

Au cours de notre étude, les deux extraits (sec et EEP) sont utilisés. Le premier est conservé à l'abri de la lumière et de la chaleur, alors que le second est conservé au réfrigérateur à -4°C.

IV-1-1-2-Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques):

Nous avons utilisé la technique NCCLS (National Commite for Clinical Laboratory Standars).

a-Préparation des disques :

Les antibiotiques habituellement testés existent sous forme de disques de 6 mm de diamètre. Pour reproduire les mêmes conditions, nous avons utilisé le papier Watman N° 3 coupé en disques (6 mm). Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques une fois découpés, nous avons procédé à leur stérilisation : ils sont placés dans une boite de pétri (en verre) contenant 10 ml d'eau distillée et autoclavés 20 minutes à 120 °C. Les disques sont préparés ensuite selon la méthode utilisée par Tichy et Novak 2000, Park et *al* 2000 et 2001: chaque disque est imprégné de 100 µl d'extrait éthanolique de propolis à 60%, 70%, 80% et 95% éthanol.

Les souches de référence: *S. aureus* ATCC 25923, *E-coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 sont fournies par L'Institut Pasteur (Alger). Les autres souches testées sont isolées de différents prélèvements : pus, ponctions pleurales, ponctions d'ascites et gorge. Les mêmes souches ont été utilisées durant toute notre étude. Pour les maintenir en vie, plusieurs repiquages par semaine sont réalisés. Les milieux utilisés sont des milieux sélectifs qui dépendent du germe testé: milieu Hektoen pour les Entérobactéries et *P. aeruginosa*, milieu de Chapman pour *S. aureus* et milieu de Müeller-Hinton additionné de 5 % de sang de mouton pour les streptocoques. Pour chaque bactérie étudiée, l'antibiogramme est réalisé une première fois, pour déterminer sa sensibilité vis à vis des antibiotiques habituellement testés. Ainsi, les valeurs des diamètres des zones d'inhibitions pour chaque antibiotique sont relevées et contrôlées régulièrement, pour nous assurer que tous les tests sont effectués dans les mêmes conditions.

b-Réalisation de l'antibiogramme :

Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non. Pour les bactéries non exigeantes, la gélose Müeller-Hinton est coulée en boite de pétri sur une épaisseur de 4 mm. Les géloses sont ensuite pré-séchées.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 18 heures sur milieu d'isolement comme suit : cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide de l'anse de platine puis déchargées dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland où à une DO de 0,08 à 0,10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum à l'aide d'un écouvillon stérile. Ce dernier est trempé dans la suspension bactérienne puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Après ensemencement en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée (le frottement se fait de haut en bas, en stries serrées cette opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois) les disques sont appliqués. Enfin, les boîtes sont laissées pendant 15 minutes à température ambiante (sur la paillasse). Puis incubées 18 h à 35°C. Après incubation les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle.

Pour les bactéries exigeantes le procédé est le même à l'exception de deux points :

- o La gélose Mueller-Hinton est additionnée de 5 % de sang de mouton.
- o L'inoculum est réalisé à partir d'une culture pure de 20 à 24 heures, sur gélose au sang de mouton.

IV-1-1-3-Détermination de la CMI (Concentration Minima Inhibitrice) :

La CMI peut être déterminée soit en milieu solide, soit en milieu liquide. Nous avons choisi la deuxième méthode parce qu'elle est plus pratique et moins coûteuse.

-préparation de la gamme de concentration de la propolis :

Deux séries de dilutions des propolis 1 et 2 (extrait sec) sont préparées en utilisant l'éthanol à 80 % comme solvant [la gélose étant constituée d'une grande quantité d'eau, son addition à la gamme de propolis entraîne la diminution du % de l'alcool, considéré en v/v (alcool absolu / eau)]. Pour la détermination des CMI des propolis 1 et 2, deux gammes de concentrations de chaque propolis sont préparées.

- **Préparation de la gamme 1 :**

Une solution mère à 2000 µg/ml est préparée en solubilisant 20 mg de l'extrait sec de la propolis (1 et 2) dans 10 ml d'éthanol à 80%. L'extrait sec est conservé plusieurs semaines à -4 °C, puis coupé en petits morceaux (il est préférable de lyophiliser l'extrait pour faciliter la pesée). A partir de la solution mère, une série de dilution est réalisée.

Le protocole est expliqué dans le tableau 6.

Tableau-6 : Préparation de la gamme 1.

Concentration initiale en µg/ml	Volume en ml	Volume d'eau distillé en ml	Concentration finale en µg/ml
2000	6,4	3,6	1280
1280	2	2	640
	1	3	320
	0,5	3,5	160
	0,5	7,5	80
80	2	2	40
	1	3	20
	0,5	3,5	10
	0,5	7,5	5
5	2	2	2,5
	1	3	1,25
	0,5	3,5	0,63
	0,5	7,5	0,32

Cette gamme de concentration a été longtemps utilisée pour la détermination des CMI des antibiotiques commercialisés. A présent, il existe des bandelettes imprégnées de concentrations décroissantes de l'antibiotique appelé E-test.

- Préparation de la gamme 2 :

Cette gamme est réalisée de manière classique. Pour chaque concentration désirée, la quantité de propolis (extrait sec) est pesée, puis additionnée à 10 ml d'éthanol à 80%. Les concentrations utilisées sont présentées dans le tableau 7.

Tableau-7: Préparation de la gamme 2.

Quantité de l'extrait sec en mg	Volume d'éthanol à 80% en ml	Concentration en µg/ml
1	10	1.10^2
2	10	2.10^2
4	10	4.10^2
6	10	6.10^2
8	10	8.10^2
10	10	10^3
20	10	2.10^3
40	10	4.10^3
60	10	6.10^3
80	10	8.10^3
100	10	10^4
120	10	$1,2.10^4$
140	10	$1,4.10^4$

-Procédé :

La détermination de la CMI est réalisée en deux temps : en premier lieu une culture en phase stationnaire de la bactérie à étudier est préparée en repiquant 0,1 ml (bacille à Gram négatif), 0,3 ml (streptocoque D, staphylocoque, *P. aeruginosa*) ou 0,6 ml (autres streptocoques) de la culture de 18 heures dans 10 ml de bouillon M-H (ou un autre bouillon adéquat pour la bactérie à étudier). Cette culture est ensuite placée au bain-marie avec agitation à 37°C pendant 3 à 5 heures, jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence (environ 5×10^7 bactéries / ml). Le bouillon ainsi obtenu est dilué en prélevant 1 ml de ce bouillon et en le mélangeant à 10 ml de bouillon M-H, préalablement chauffé à 37°C.

Les boîtes de pétri sont préparées simultanément en déposant 2 ml de chaque dilution de la gamme de propolis dans une boîte, en allant de la concentration la plus faible à la concentration la plus forte. Une boîte témoin contenant 2 ml d'eau distillée est ajoutée. 18 ml de la gélose M-H sont ensuite ajoutés à chaque boîte en agitant légèrement pour bien mélanger.

Les boîtes de pétri sont laissées quelques minutes sur la paillasse pour solidifier la gélose, puis séchées pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C (boîtes ouvertes). L'ensemencement en strie, à l'anse de platine ou à la pipette rodée, est ensuite réalisé sur toutes les boîtes contenant la propolis et la boîte témoin. Enfin, les boîtes sont incubées 18 heures à 37°C. Après incubation la Concentration Minima Inhibitrice (CMI) est déterminée: c'est la concentration pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible.

NB: Les deux gammes de concentrations sont testées en parallèle.

IV-1-2-Etude du profil chimique :

La composition chimique de la propolis des zones tempérées est peu étudiée. Cependant, des études effectuées sur certaines de ces propolis montrent la présence des flavonoïdes, molécules soupçonnées d'être à l'origine de certains effets biologiques de la propolis.

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés au profil chimique des propolis algériennes. Les produits flavoniques sont recherchés et séparés par chromatographie sur couche mince, chromatographie sur papier et absorption en UV-visible.

- **Absorption en UV-visible :**

Les spectres d'absorption en UV-visible des filtrats des propolis 1, 2, 3 et 4 sont réalisés selon la méthode utilisée par Park et *al* 1998: 25µl du filtrat (1g de propolis dans 10 ml d'éthanol à 80%) sont dilués dans 30 ml d'éthanol à 95%. Les spectres d'absorption UV-visible des quatre propolis sont ainsi enregistrés à 200-600 nm.

- **Séparation:**

- ✓ ***Chromatographie sur papier :***

C'est la méthode chromatographique la plus anciennement utilisée pour séparer les mélanges des composés polaires. Le support est le papier Watman N⁰ 3 qui est l'un des supports les plus convenants pour séparer et purifier d'assez importantes quantités de produits. Le système solvant utilisé est l'acide acétique à 15 %. Ce système améliore la séparation et l'ionisation des molécules. Pour une chromatographie monodimensionnelle avec l'acide acétique à 15 %, un aglycone s'éloigne peu de la ligne de départ, tandis qu'un glycoside a un R_f (rapport frontal) proportionnel au nombre de sucres liés ; un dioside migre plus qu'un monoside (Combiér 1968).

Pour avoir la carte flavonique des extraits testés et comparer leur composition chimique, une chromatographie bidimensionnelle est réalisée. Cette méthode donne en général une très bonne séparation des hétérosides flavoniques. Les systèmes solvants utilisés sont le

BAW (4/1/5): n-butanol- acide acétique- eau en premier et l'acide acétique à 15 % en second. Pour reproduire les mêmes conditions, les 3 extraits sont testés en même temps. Les différentes bandes de produits présents dans le chromatogramme sont délimitées sous lumière de Wood à 360 – 366 nm.

✓ *Chromatographie sur couche mince (CCM) :*

Le substrat utilisé est le gel de silice, obtenu à partir de silicates de sodium ou de potassium, auxquels on ajoute un acide. Ce gel peut former des liaisons hydrogènes entre les hydroxyles rattachés au squelette silicié et les substances polaires.

La chromatographie sur couche mince est réalisée selon la méthode utilisée par Vanhaelen et al 1980 : le système solvant utilisé est l'éthanol à 95 % / eau distillé à 55/45. Les bandes de produits sont observées par UV à 254 et 336 nm. La fluorescence sous lumière UV ainsi que la valeur du Rf accessible immédiatement à l'examen du chromatogramme apportent un certain nombre d'informations sur la structure du composé flavonique comme la classe à laquelle il appartient.

IV-1-3-Extraction et analyse des huiles essentielles :

L'aromathérapie existe depuis près de 60 siècles. Des écrits font état de son emploi en médecine traditionnelle dans pratiquement toutes les civilisations. Elle a pour objectif de renforcer et de stimuler les systèmes de défense. Cependant, son utilisation a pour but la prévention de quelques maladies.

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles tel que : Rutacées, Ombellifères, Labiées....etc. Ces huiles se retrouvent aussi dans la propolis caractérisée le plus souvent par une odeur très agréable. Cette odeur est due à la présence de ces métabolites qui malgré leur faible proportion peuvent être responsable de plusieurs propriétés biologiques de la propolis. Plusieurs études se sont intéressées aux huiles essentielles de la propolis (Bankova *et al* 1994 et 1999, Soares Toress *et al* 2008, Borcic *et al* 1998, Melliou *et al* 2007). Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur la propolis algérienne. Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à quelques propolis de l'Est algérien. Cette diversité est utilisée pour réaliser une comparaison de leur composition chimique en huiles essentielles.

IV-1-3-1- Extraction :

100 g des propolis P₁ (El-malha), P₂ (Benibelaid) et P₃ (Kaous) sont hydrodistillées durant 4H. Les fractions aqueuses ainsi obtenues sont extraites par l'éther diéthylique pour obtenir une phase organique. Cette dernière est séchée (sulphate de sodium), filtrée et conservée à + 4° C jusqu'à son analyse par GC-MS.

IV-1-3-2- Analyses GC-MS :

Les analyses GC-MS ont été effectuées sur un appareil Perkin Elmer Clarus 500 gas chromatograph, équipé d'une colonne Elite-5MS capillary column (60 m X 0.255 mm i.d, épaisseur de film 0.25 µm) et d'un détecteur de masse. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml / min. La température initiale est 40°C pendant 10 min. Cette température est augmentée progressivement jusqu'à 270°C à raison de 3°C / min. La détection GC-MS est réalisée par un système d'ionisation électronique avec un potentiel d'ionisation de 70 eV.

Les huiles essentielles des propolis P₁, P₂ et P₃ sont diluées à 1 / 100 (V / V) dans le n-hexane pour obtenir les solutions A, B et C respectivement. 40 µl de ces solutions sont prélevés et dilués à ¼ (V / V) dans le n-hexane puis analysés par GC-MS (Atungulu *et al* 2007). Les composants des huiles essentielles sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention (R_t) et leurs MS avec les données des bibliothèques NIST (National Institute of Standards and Technology) et Wiley. La bande de scan est de 50-450 amu (atomic mass units). Le temps de scan est de 0,5 s. La température d'injection et de détection est 250°C.

IV-2- Etude de la propolis de Benibelaid :

Pour la suite de notre travail nous avons choisi d'étudier la propolis de Benibelaid. D'une part cette propolis possède un profil chimique intéressant et la quantité récoltée nous permet de poursuivre les investigations phytochimiques. De plus, cette propolis semble avoir une bonne activité antibactérienne.

IV-2-1-Etude de l'activité cicatrisante :

Notre travail s'intéresse à l'effet cicatrisant de la propolis de Benibelaid. Cette activité est étudiée en complément de l'activité antibactérienne pour expliquer l'efficacité rapportée de l'utilisation de la propolis en médecine traditionnelle dans le traitement des plaies infectées. Nos tests ce sont concentrés sur la comparaison de l'effet local de certaines préparations à base de propolis.

IV-2-1-1- Extraction :

C'est la première étape de notre étude. Nous avons procédé à l'extraction des substances bioactives. Le solvant utilisé est l'éthanol à 80%. La propolis a été pesée puis additionnée du volume adéquat de solvant.

IV-2-1-2-Méthode:

Nous avons préparé une solution à 30% de propolis : 9 g de propolis dans 30 ml d'éthanol à 80%. La propolis brute est coupée en petits morceaux et mise dans un récipient. Si elle est trop molle, elle est placée au réfrigérateur pendant quelques heures puis coupée. Après ajout de l'éthanol, elle est laissée pour macération pendant 7 jours avec agitation de temps en temps. Puis, le mélange est filtré deux fois sur papier filtre ou du coton. Enfin, le filtrat est évaporé en utilisant un évaporateur de type rotatif. L'extrait brut est conservé à l'abri de la lumière et de la chaleur, conditions nécessaires pour garder intacts tous les composants de la propolis.

IV-2-1-2-a-Préparations testées :

Au cours de notre travail nous avons testé deux préparations :

-Extrait éthanolique de la propolis à 30%.

-Remède à base de propolis préparé selon la méthode de Barral et *al* 1992: Nous avons pesé 9 g de vaseline (excipient) puis mélangé un peu de cette dernière avec 1 ml d'une solution à 30% de propolis jusqu'à homogénéisation. Le reste de la vaseline est ajouté petit à petit en triturant jusqu'à parfaite homogénéisation.

IV-2-1-2-b-Entretien des animaux :

Notre étude a été réalisée sur des rats femelles de souches albinos pesant entre 97,2 et 189 g, provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Avant et après le traitement, les animaux sont placés dans des cages en plastique avec libre accès à la nourriture (croquettes) et à l'eau. L'animalerie est soumise à une photo-période de 12 / 24 heures.

IV-2-1-2-c-Traitements des animaux :

• Plaies cutanées :

Nous avons utilisé 8 rats répartis en 2 lots, chacun contenant 4 rats. Les plaies cutanées ont été réalisées en combinant les deux méthodes de Subramoniam et *al* 2001 et Melpomeni et *al* 2003. Pour chaque rat, 2 plaies cutanées sont réalisées sur la partie antéro-dorsale. Après induction de l'anesthésie, les rats sont rasés sur la partie souhaitée. Puis, deux zones d'environ 100 mm² chacune sont délimitées et nettoyées par la Bêta-dinne puis par l'éthanol à 70% pour éviter toute contamination ou tout processus qui ralentirait la cicatrisation (infection des plaies). Enfin, après application d'une tension de la peau à inciser, une ouverture superficielle de la surface délimitée est réalisée. Après incisions les rats sont placés dans des cages individuelles.

Les rats après incision des plaies sont représentés dans la photo -4.



Photo -4 : Rats après incision des plaies.

Les bonnes incisions doivent être :

- Franches, nettes, exécutées d'un seul trait de bistouri, la peau ayant été bien tendue.
- Assez longues pour bien exposer les éléments sous-jacents, plus étendues sur les sujets gras que sur les maigres.
- Dégradées, plus longues pour la peau que pour les aponévroses sous-jacentes. Correctement orientées pour éviter les tractions ultérieures sur les lèvres, causes de désunions ultérieures des sutures et de mauvaises cicatrifications (Marcenac 1974).

• **Traitements des plaies :**

Après réalisation des plaies, les animaux sont traités comme suit :

Lot n°1 : désigné comme lot témoin

- La première plaie ne reçoit aucun traitement. Elle est considérée comme contrôle négatif.
- La deuxième plaie est traitée par la vaseline. Elle est considérée comme contrôle positif.

Lot n°2 : désigné comme lot traité.

- La première plaie est traitée par l'extrait de la propolis à 30%.
- La deuxième plaie est traitée par le remède à base de la propolis.

Les traitements sont appliqués quotidiennement au matin, durant 18 jours consécutifs. Toutes les règles de l'asepsie ont été respectées. L'application des différents traitements est réalisée à l'aide d'un écouvillon stérile renouvelé à chaque application et pour chaque rat. L'observation macroscopique des différentes plaies est réalisée avant chaque nouvelle application. Toutes les plaies sont laissées à l'air libre.

Durant toute la période de notre étude, nous avons contrôlé certains paramètres :

- **Poids des rats :** les rats ont été pesés au 1^{er}, 3^{ème}, 6^{ème}, 9^{ème}, 12^{ème}, 15^{ème} et 18^{ème} jour.
- **Comportement des animaux.**
- **Apparition de rougeur, d'œdème et de bourgeon**
- **Apparition disparition de la croûte**
- **Surfaces des plaies :** L'évolution de la cicatrisation a été appréciée selon la méthode de Subramoniam et al 2001 : Nous avons mesuré le pourcentage de la réduction de la surface de la plaie par rapport à la surface de la plaie initiale :

$$\frac{\text{Surface initiale} - \text{surface de la plaie à } (t = x) \times 100}{\text{Surface initiale}}$$

Cette évolution est suivie durant le 1^{er}, 2^{ème}, 4^{ème}, 8^{ème}, 12^{ème}, 16^{ème} et 18^{ème} jour.

IV-2-1-2-d-Analyse statistique :

Les résultats numériques et graphiques sont présentés sous forme de moyenne (\bar{X}) \pm écart type (s). Pour la comparaison des moyennes nous avons utilisé le test de Student.

IV-2-2-Etude phytochimique de la propolis P₂ :

La propolis (500 g) a été récoltée (après la miellée) par grattage et raclage de l'entrée et des parois de la ruche. Elle provient de la région de Benibelaïd (Jijel). Elle est de couleur jaune et d'une odeur agréable.

IV-2-2-1-Extraction :

La propolis est coupée en petits morceaux puis laissée pour macération dans un mélange méthanol-eau (70 : 30) pendant 7 jours. Cette opération est répétée trois fois, avec renouvellement du solvant. Les extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et évaporés à sec jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux. Ce dernier est repris par de l'eau distillée bouillante. Une décantation à la chambre froide pendant une nuit permet le dépôt des composés hautement lipophiles (cires, graisses.....). La solution ainsi dégraissée subit plusieurs filtrations. La phase aqueuse obtenue subit trois affrontements au n-hexane, trois affrontements au chloroforme, trois affrontements à l'acétate d'éthyle et deux affrontements au n-butanol. L'acétate d'éthyle entraîne les aglycones et certains hétérosides (les mono-O-glycosides et les di-O-glycosides) alors que le n-butanol entraîne le reste des di-O-glycosides, les tri-O-glycosides et les C-glycosides (Hassan 1976). Après évaporation à sec sous pression réduite, les extraits sont repris chacun par un minimum de méthanol.

Pour étudier les composés moyennement polaires de la propolis une autre extraction est réalisée comme suit :

La propolis (250 g) est extraite par un mélange méthanol-dichlorométhane (1 / 1). Les différentes fractions récupérées sont ensuite réunies et évaporées sous pression réduite à 35°C. L'extrait ainsi obtenu (137 g) est appelé extrait 1 / 1. Le schéma général de l'extraction est représenté ci-après.

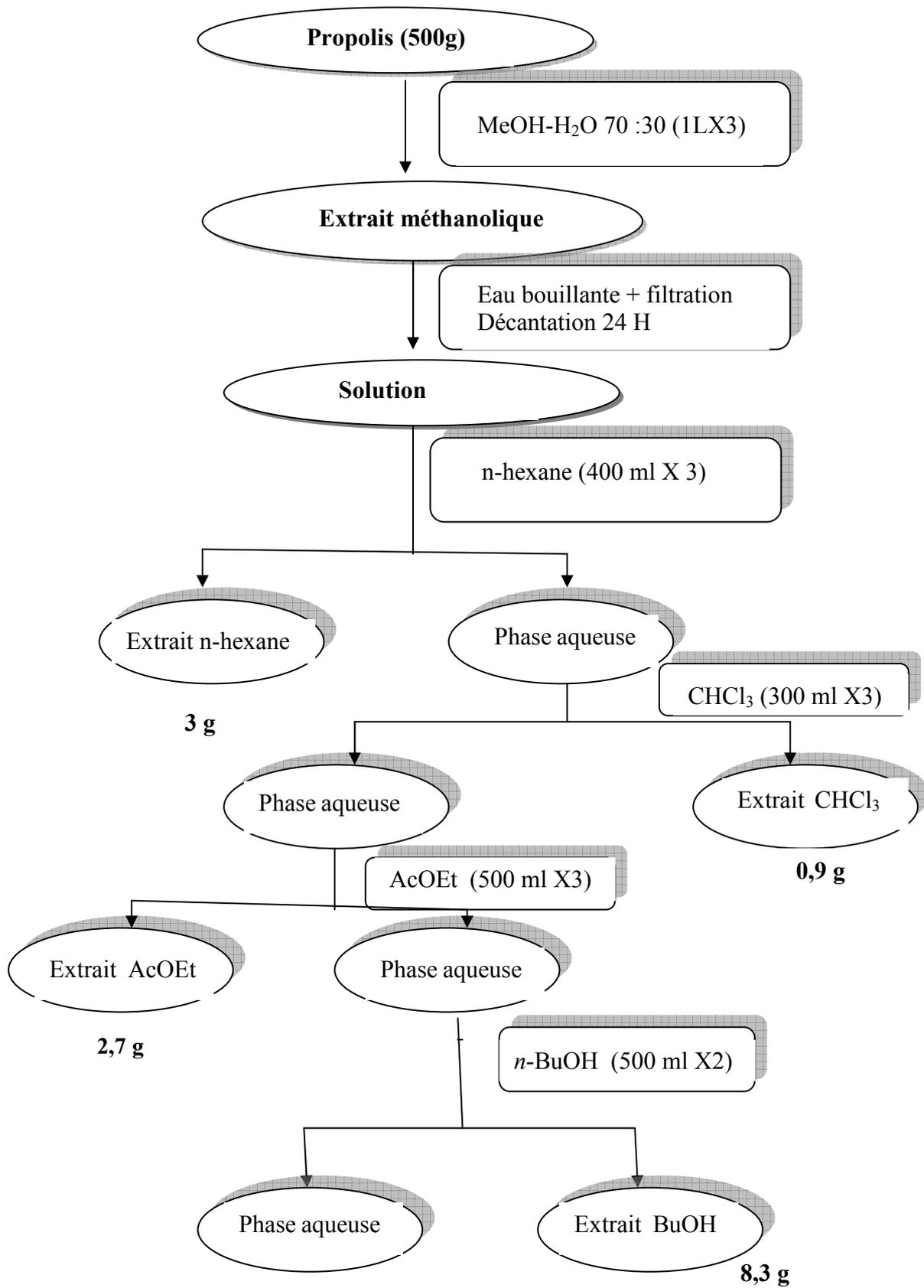


Schéma-3: Protocole d'extraction de la propolis.

IV-2-3-Méthode de séparation et purification :

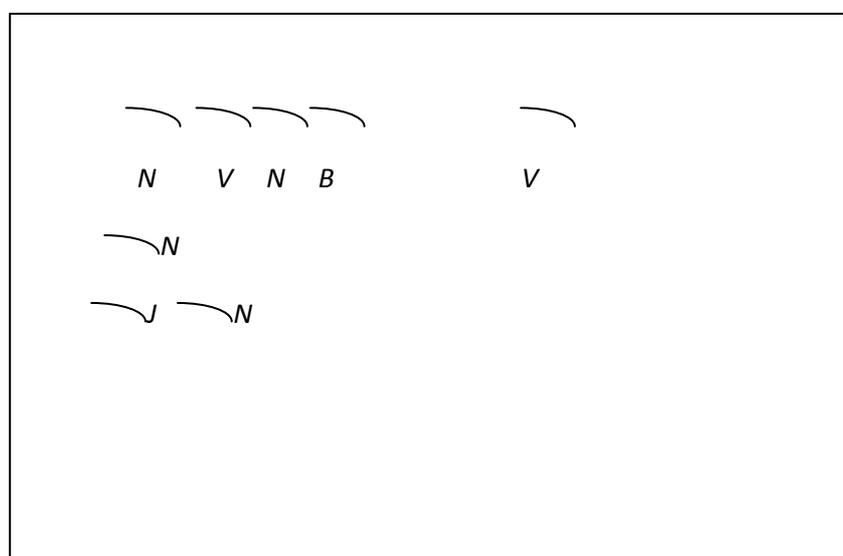
Nous nous sommes intéressés à la séparation et à l'identification des composés flavoniques de la propolis algérienne. Avant d'effectuer toute séparation, nous avons analysé la carte flavonique des différents extraits. Cette carte est réalisée par chromatographie bidimensionnelle sur polyamide DC6 en utilisant les systèmes solvants suivants :

S₁ : toluène / MEC / MeOH (4 : 3 : 3).

S₂ : H₂O / MeOH / MEC / AC₂CH₂ (13 : 3 : 3: 1).

IV-2-3-1- Séparation des composants de l'extrait acétate d'éthyle :

La carte flavonique de cette phase (schéma-4) montre la présence de plusieurs produits. En raison du nombre de ces produits, nous avons choisi une séparation sur colonne de gel de silice.



V : Violet

N : noire

B : bleu

J : jaune

Schéma-4 : Carte flavonique de la phase acétate d'éthyle.

➤ ***Séparation sur colonne :***

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduit à utiliser comme système d'élution le dichlorométhane / méthanol en gradient de polarité.

L'extrait acétate d'éthyle (2,7 g) est déposé sur une colonne de gel de silice préparé dans le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système dichlorométhane / méthanol en commençant par du CH₂Cl₂ 100% et en terminant par le méthanol 100% en récupérant des fractions de 25 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont

visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). Le tableau-8 rassemble la progression de cette colonne.

Tableau-8: Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle.

CH₂CL₂	MeOH	N° de la fraction	Observations
100	0	1-6	Graisses et cires
90	10	7-11	Mélange complexe
		12	Monotache
		13	Mélange séparable
		14-16	Mélange séparable (non traité)
		17-24	Monotache
		32-40	Mélange séparable
		41-61	Mélange séparable
85	15	62-68	Mélange séparable
80	20	69-97	Mélange séparable
70	30	113-118	Mélange séparable
60	40	119-133	Mélange séparable
50	50	134-148	Mélange complexe
40	60	149-154	Mélange complexe
30	70	155-160	Mélange complexe
20	80	161-166	Mélange complexe
10	90	167-176	Mélange séparable (non traité car petite quantité)
0	100	177-183	Mélange séparable (non traité car petite quantité)

Les différentes fractions recueillies sont regroupées selon leur profil chromatographique dans différents systèmes :

- dichlorométhane / méthanol avec différents pourcentages.
- Ether de pétrole / acétate d'éthyle avec différents pourcentages.

L'analyse par chromatographie sur couche mince des fractions obtenues a permis de les regrouper en 12 sous fractions. Le tableau-9 représente ce rassemblement.

Tableau-9: Regroupement des fractions de la phase acétate d'éthyle.

Fractions	Observations
f1-6	Graisses et cires
f7-11	Mélange complexe
f12	Monotache
f13	Mélange séparable
f14-16	Mélange séparable (non traité)
f17-24	Monotache
f32-40	Mélange séparable
f41-61	Formation d'un précipité
f62-117	Mélange séparable
f118-133	Mélange séparable
f134-154	Mélange complexe
f155-166	Mélange complexe

A cause de leur simplicité les sous fractions f13, f17-24, f32-40, f41-61 sont ensuite traitées en utilisant différentes méthodes :

- La fraction f13 est séparée par chromatographie sur couche mince avec le système CH_2Cl_2 / MeOH (8 / 2) pour donner les produits F_{13-1} (5 mg) et F_{13-2} (11 mg). Le support utilisé est le gel de silice.
- La fraction f17-24 est purifiée sur colonne de séphadex LH 20 pour donner le produit F_{a-p1} (30 mg).
- La fraction f32-40 est séparée sur colonne de gel de silice.
- Le précipité obtenu à partir de la fraction f41-61 est lavé avec du méthanol jusqu'à ce que le surnageant soit transparent. Le précipité jaune insoluble dans le méthanol est appelé produit F_e (42,5 mg). Le surnageant est purifié par CCM sur gel de silice avec le système hexane / acétate d'éthyle (1 / 1) pour donner le produit F_{e-1} (11 mg).

✓ *Etude de la sous fraction f32-40 :*

Nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium. La meilleure séparation a été obtenue avec le système éther diéthylique / acétate d'éthyle (9 / 1).

La fraction f32-40 (100 mg) est déposée sur gel de silice préparé dans l'éther diéthylique. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système éther diéthylique / acétate d'éthyle. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau-10.

Tableau-10: fractions issues de la séparation de la sous fraction f32-40.

Pourcentage		Fractions	Observations
Ether diéthylique	Acétate d'éthyle		
100	0	1-3 4-5	Traces de produits Mélange séparable (non traité car en petite quantité)
90	10	6-9	Monotache
70	30	10-15	Mélange séparable (non traité car en petite quantité)
50	50	16-18	Mélange séparable (non traité car en petite quantité)
30	70	19-31	Mélange séparable (non traité car en petite quantité)
0	100	32-39	Mélange séparable (non traité car en petite quantité)

La sous fraction f6-9 est purifiée sur colonne de séphadex LH 20 pour donner le produit SC1-F₆₋₉ (5 mg). Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle a permis la séparation de 6 composés identifiés par les différentes analyses spectrales UV-visible, RMN-H¹, RMN-C¹³ et la spectrométrie de masse en impact électronique (EI-MS). Parmi les produits séparés deux sont identiques (F_{a-p1} et F_e) (schéma-3).

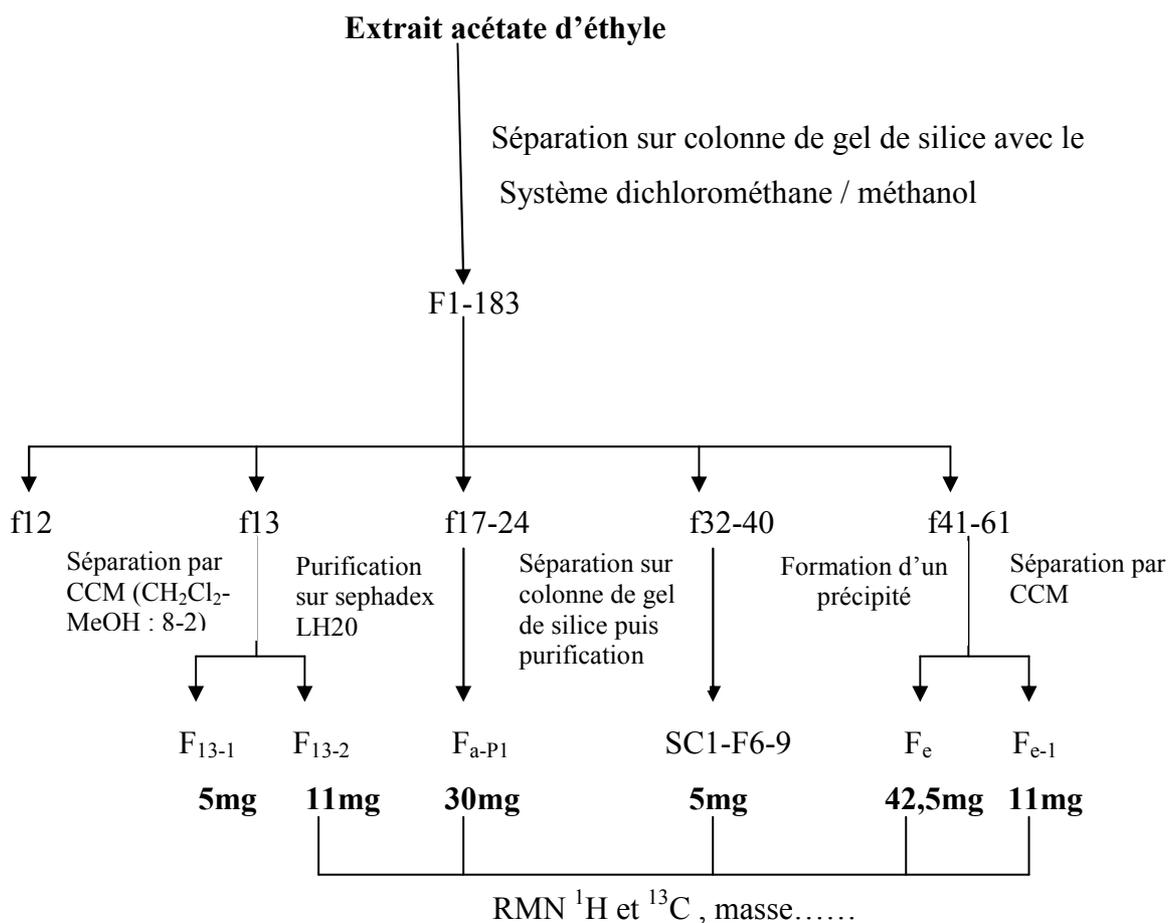


Schéma-5: Récapitulatif des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle.

IV-2-3-2- Séparation et purification des composants de l'extrait 1 / 1 :

Les analyses chromatographiques de cet extrait réalisées par chromatographie sur papier avec les systèmes BAW (4 / 1 / 5) et AcOH 15 % ainsi que par chromatographie sur couche mince montrent la présence de plusieurs composés qui peuvent être de nature flavonique. En raison de la richesse de cette phase et de sa quantité nous avons choisi une séparation en flash colonne. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduit à utiliser le système cyclohexane / dichlorométhane / méthanol.

L'extrait 1 / 1 (30 g) est déposé sur une colonne de gel de silice préparé dans le cyclohexane. L'éluion est réalisée par un gradient de polarité du système cyclohexane / dichlorométhane en commençant par le cyclohexane 100% et en terminant par le dichlorométhane 100% en récupérant des fractions de 500 ml. Le méthanol est ensuite introduit en réalisant un gradient de polarité du système dichlorométhane / méthanol jusqu'à 100% méthanol. Le suivi des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de

gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV à 254 nm et 365 nm. Le tableau-11 rassemble la progression de cette colonne.

Tableau-11 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait 1 / 1.

Pourcentage			Fraction	Observation
Cyclohexane	Dichlorométhane	Méthanol		
100	-	-	1-4	Graisses et cires
			5	Mélange séparable
			6	Mélange séparable
75	25	-	6	Mélange séparable
			7	Mélange séparable
			8-9	Mélange séparable
			10	Mélange séparable
50	50	-	11-12	Mélange séparable
			13	Formation d'un précipité
25	75	-	14	Formation d'un précipité
10	90	-	15	Formation d'un précipité
			16	Formation d'un précipité
0	100	-	17	Formation d'un précipité
-	90	10	18-20	Mélange séparable
-	80	20	21-22	Mélange séparable
-	70	30	23	Mélange séparable
-	60	40	24	Mélange séparable
-	50	50	25	Mélange séparable
-	25	75	26	Mélange séparable
-	-	100	27	Mélange séparable

Les différentes fractions recueillies sont regroupées selon leur profil chromatographique dans les systèmes :

-dichlorométhane / acétate d'éthyle avec différents pourcentages.

-hexane / éther diéthylique avec différents pourcentages.

Les CCM des fractions obtenues ont permis de les regrouper en 20 sous fractions. A cause de leur simplicité les sous fractions f5, f6, f13, f14, f15, f16 et f17 sont ensuite fractionnées en utilisant différentes méthodes :

- Les sous fractions f5 et f6 sont séparées chacune sur colonne de gel de silice.
- Le précipité obtenu à partir de la sous fraction f13 est recristallisé dans le chloroforme pour donner le produit F₁₃ sous forme de cristaux.
- Le précipité obtenu à partir de la sous fraction f14 est lavé avec du chloroforme jusqu'à ce que le surnageant soit transparent. Le précipité jaune insoluble est un mélange de trois produits. Un autre précipité est formé au niveau du chloroforme. Les tests chromatographiques ont montré une monotache. Ce composé est appelé F₁₄.
- Les précipités obtenus à partir des sous fractions f15, f16 et f17 sont lavés avec du MeOH jusqu'à ce que le surnageant soit transparent. Les précipités jaunes insolubles dans le méthanol sont appelés F₁₅, F₁₆ et F₁₇ respectivement.

- **Etude de la sous fraction F5 :**

Nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice, la meilleure séparation est réalisée par un système hexane / éther diéthylique.

La sous fraction F₅ (416 mg) est déposée sur une colonne de gel de silice. La séparation est réalisée par un système isocratique : hexane / éther diéthylique (3 / 1). Les différentes fractions recueillies sont regroupées selon leur profil chromatographique. Le tableau-12 représente le rassemblement de ces sous fractions.

Tableau-12: Rassemblement des fractions de la sous fraction f5.

Fraction	Observation
1-6	Graisses et cires
7-10	Traces de produits
11-13	Traces
14-16	Mélange séparable
17-24	Monotache
25-30	Mélange séparable
31-41	Mélange séparable (petite quantité)
42-44	monotache
45	Mélange séparable (petite quantité)
46-49	Mélange séparable (petite quantité)
50-60	Mélange complexe
60-65	Mélange complexe

L'étude de la sous fraction f5 a permis la séparation de deux produits f₁₇₋₂₄ (100 mg) et f₄₂₋₄₄ (15 mg). Ces produits sont identiques. Les autres fractions séparables ne sont pas traitées.

- **Etude de la sous fraction F6 :**

Les analyses chromatographique de cette sous fraction ont permis de choisir comme système de séparation un système ternaire cyclohexane / dichlorométhane / méthanol. La sous fraction F6 (1,97g) est déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans le cyclohexane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système cyclohexane / dichlorométhane en commençant par le cyclohexane à 100% et en terminant par le dichlorométhane 100%. Le méthanol est ensuite introduit. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système dichlorométhane / méthanol en commençant par le dichlorométhane 100% et en terminant par le méthanol 100%. Le suivi des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées à la vanilline. Le tableau-13 rassemble la progression de cette colonne.

Tableau-13: Fractions issues de la séparation sur colonne de la sous fraction F6.

Pourcentage			Fraction	Observation
Cyclohexane	CH ₂ Cl ₂	MeOH		
100	-	-	1-4	Graisses et cires
95	5	-	5	Mélange séparable (petite quantité)
85	15	-	6	Mélange séparable (petite quantité)
			7	Monotache
			8-16	Mélange séparable (petite quantité)
			17-22	Monotache
			23-25	Mélange séparable (petite quantité)
80	20	-	26-54	Mélange séparable
			55-57	Monotache
70	30	-	58	Monotache
			59-60	Monotache
			61-69	Mélange séparable
			70-73	Mélange séparable
60	40	-	74-92	Mélange séparable
50	50	-	93-104	Mélange séparable
40	60	-	105-112	Mélange séparable
30	70	-	113-115	Mélange séparable
20	80	-	116-121	Mélange séparable
-	100	-	122-124	Mélange séparable
-	80	20	125-127	Mélange séparable
			128	Formation d'un précipité
			129-130	Mélange séparable
-	60	40	131-135	Mélange séparable
-	40	60	136-138	Mélange séparable
-	20	80	139-141	Mélange séparable
-	-	100	142-155	Mélange séparable

Les différentes fractions issues sont regroupées selon leur profil chromatographique. Les CCM des fractions obtenues ont permis de les regrouper en 26 sous fractions. Les sous fractions F7 (7 mg) , F17-22 (15 mg), F55-57 (61 mg), F58 (30 mg), F59-60 (30 mg) et F128 (15 mg) sont obtenues sous forme de monotache. Ces sous fractions sont purifiées sur colonne de gel de silice avec du chloroforme pour donner les produits C-f7, C-f17-22, C-f55-57, C-f58 et C-f59-60.

Le fractionnement de l'extrait 1 / 1 a permis la séparation de 12 composés dont 3 (F₁₅, F₁₆ et F₁₇), 2 (C-f55-57, C-f58) et 2 (F₁₇₋₂₄ et F₄₂₋₄₄) sont identiques. Les produits C-f7, C-f17-22, C-f59-60 et F128 sont en cours d'identification (schéma-4).

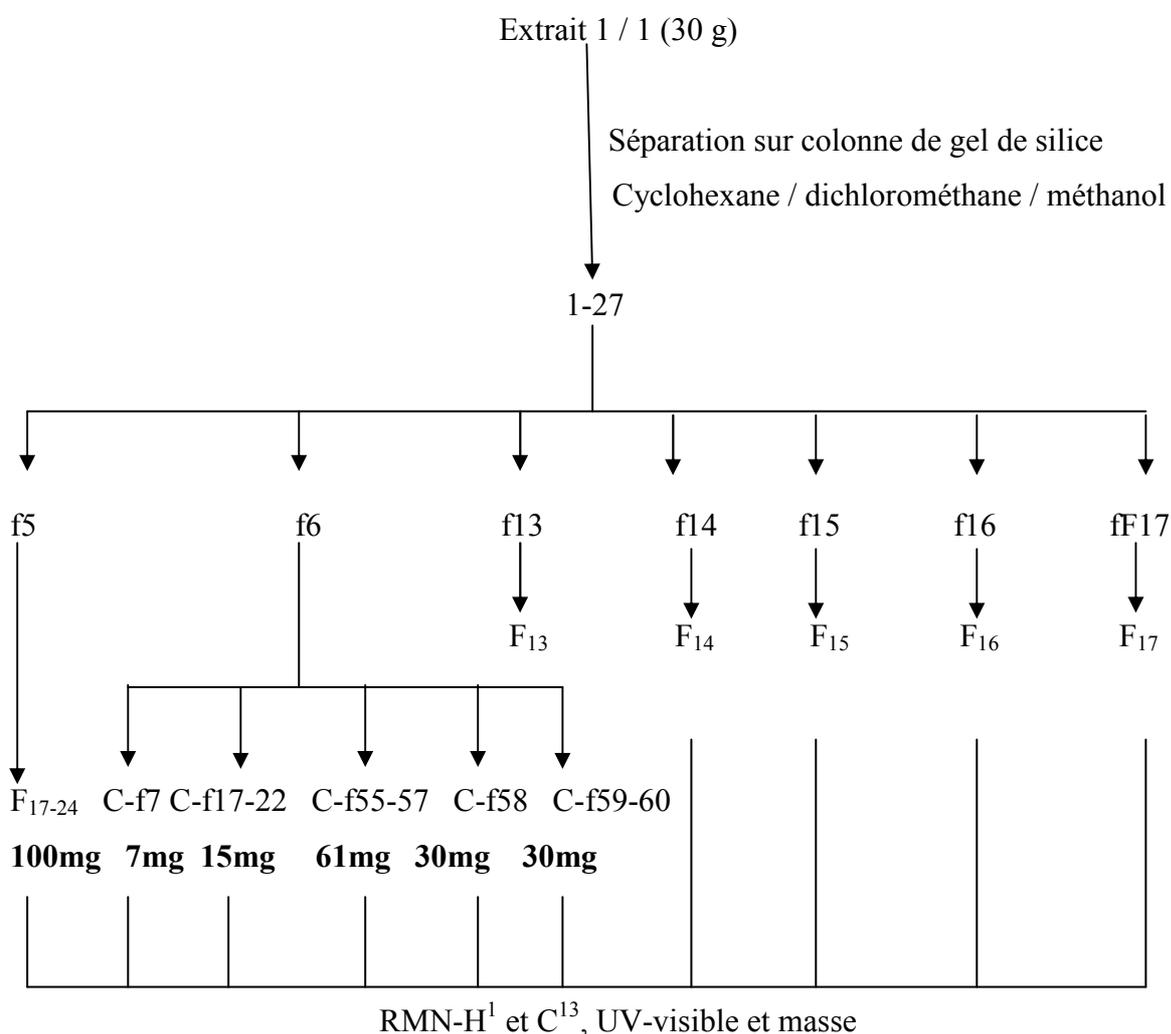


Schéma-6: Récapitulatif des composés isolés de l'extrait 1 / 1.

IV-3-Fractionnement bioguidé de principes inhibiteurs des métalloprotéinases

matricielles :

Les métalloprotéinases matricielles sont des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire. Ils interviennent dans de nombreux processus physiologiques tel que la cicatrisation, l'embryogenèseL'altération de l'équilibre entre l'expression de ces enzymes et leurs inhibiteurs conduit à l'apparition de nombreux phénomènes pathologiques tel que l'inflammation, les cancers.....etc. En raison du rôle des MMPs dans l'apparition de nombreuses pathologies, ils constituent un modèle intéressant pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques susceptibles d'inhiber ces enzymes ou de participer au contrôle de leur expression. Ces molécules peuvent être obtenues par synthèse organique d'analogues chimiques des inhibiteurs existants ou des produits naturels séparés et identifiés et pouvant avoir une nouvelle structure chimique.

L'objectif de ce travail consiste à évaluer l'effet inhibiteur des extraits éthanoliques des propolis P₁ et P₂ sur les MMPs et de déterminer la composition chimique de ces extraits. Ces deux propolis sont choisies en raison de leur grande quantité et de leur profil chimique très intéressant.

IV-3-1- Fractionnement bioguidé de l'extrait butanolique :

Nous avons testé l'effet inhibiteur des extraits bruts (extrait hydroalcoolique) des propolis P₁ (El-malha) et P₂ (Benibelaid) et des extraits acétate d'éthyle et butanolique de la propolis P₂. Nos résultats ont montré que les extraits de la propolis P₂ et principalement l'extrait butanolique inhibent fortement la plasmine et quelques MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3....). Pour ces raisons, cet extrait est ensuite fractionné par chromatographie sur colonne afin de séparer ces composants et de déterminer si l'effet inhibiteur des enzymes testées est dû à la présence d'un seul produit, considéré dans ce cas comme principe actif ou à une synergie entre les différents composants de cet extrait.

Les analyses chromatographiques de cet extrait par chromatographie sur papier avec les systèmes BAW n-butanol / acide acétique/ eau (4 / 1 / 5) et AcOH 15% montrent la présence de plusieurs produits. La carte flavonique de cet extrait est réalisée par chromatographie bidimensionnelle avec les systèmes BAW et AcOH 15% pour le papier et toluène/méthyléthylcétone/méthanol (4/3/3) et eau/méthyléthylcétone/méthanol/acétylacétone (13/3/3/1) pour le polyamide DC6. Ce dernier est considéré comme un support de choix pour la séparation des flavonoïdes sous leur forme aglycone et glycoside.

En raison de la richesse de cette phase nous avons choisi une séparation sur colonne. L'extrait butanolique (8,3 g) est déposé sur colonne de polyamide SC6 dans le toluène. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système toluène / méthanol en commençant par le toluène 100% et en introduisant le méthanol jusqu'à 100% et en récupérant des fractions de 250 ml. L'élution est ensuite poursuivie avec les systèmes méthanol / eau aux proportions 70 / 30 et 50 / 50. Le suivi des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). Le tableau-14 rassemble la progression de cette colonne.

Tableau-14 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait butanolique.

Pourcentage			Fraction	Observation
Toluène	Méthanol	Eau		
100	-	-	1-4	Graisses et cires
90	10	-	5-8	Graisses et cires
80	20	-	9-12	Trace de produit
70	30	-	13-16	Trace de produit
60	40	-	17-20	Trace de produit
50	50	-	21-24	Mélange séparable
40	60	-	25-28	Mélange séparable
30	70	-	29-32	Mélange séparable
20	80	-	33-36	Mélange séparable
10	90	-	37-40	Mélange séparable
-	100	-	41-44	Mélange séparable
-	70	30	45-48	Mélange complexe
-	50	50	49-52	Mélange complexe

Les différentes fractions recueillies sont regroupées selon leur profil chromatographique en 5 sous fractions. Le tableau-15 montre le regroupement de ces fractions.

Tableau-15: Regroupement des fractions de l'extrait butanolique.

N° de la fraction	Observations	Sous fraction
1-8	Graisses et cires	-
9-20	Trace de produit	-
21-24	Mélange séparable	B ₁
25-28	Mélange séparable	B ₂
29-44	Mélange séparable	B₃
45-48	Mélange complexe	B ₄
49-52	Mélange complexe	B ₅

A ce niveau de notre étude, les sous fractions B₁, B₂, B₃, B₄ et B₅ sont testées à leur tour pour un éventuel effet inhibiteur de la plasmine et des métalloprotéinases matricielles de manière à ne sélectionner que la sous fraction active. La sous fraction B₃ sur laquelle nous avons concentré nos efforts inhibe fortement la plasmine et les MMPs avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du µg/ml. Cette sous fraction est la plus active et semble renfermée des composés (principes) susceptibles d'inhiber les enzymes testées (plasmine et MMPs).

Le profil de cette sous fraction est ensuite réalisé par chromatographie analytique CLPH. Le système utilisé est un système binaire eau / acétonitrile en gradient de polarité. Le détecteur UV est réglé à 280 et 325 nm.

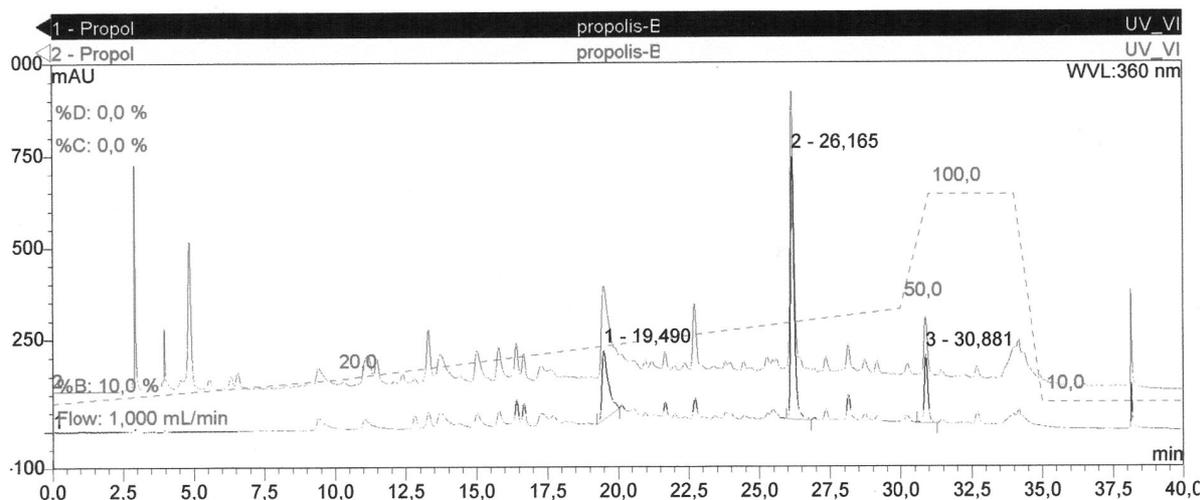


Figure-14 : Chromatogramme de la sous fraction B₃.

Nos analyses ont montré la présence de composés polaires qui absorbent sous UV. Ces composés sont recherchés et séparés par HPLC-semi préparative. Ainsi, 100 mg de la

sous fraction B₃ sont séparés par HPLC-semi préparative (colonne RP-18, Thermo Electron Corporation hyperprep HS, 21,2 X 250 mm, 10 μ). Les éluants utilisés sont H₂O/ 0,0025% TFA (trifluoroacétique) comme éluant A et l'acétonitrile (CH₃CN) comme éluant B avec un débit de 5 ml / min. Le détecteur UV est réglé à 280 et 325 nm. L'éluion est réalisée par 10% du solvant B. Le pourcentage est ensuite augmenté jusqu'à 50% de B pour offrir cinq composés à l'état pur appelés : B₃₋₄, B₃₋₈, B₃₋₁₀, B₃₋₁₂ et B₃₋₁₅ au bout de 45 minutes. La figure-15 représente le schéma récapitulatif de la séparation des produits de l'extrait butanolique.

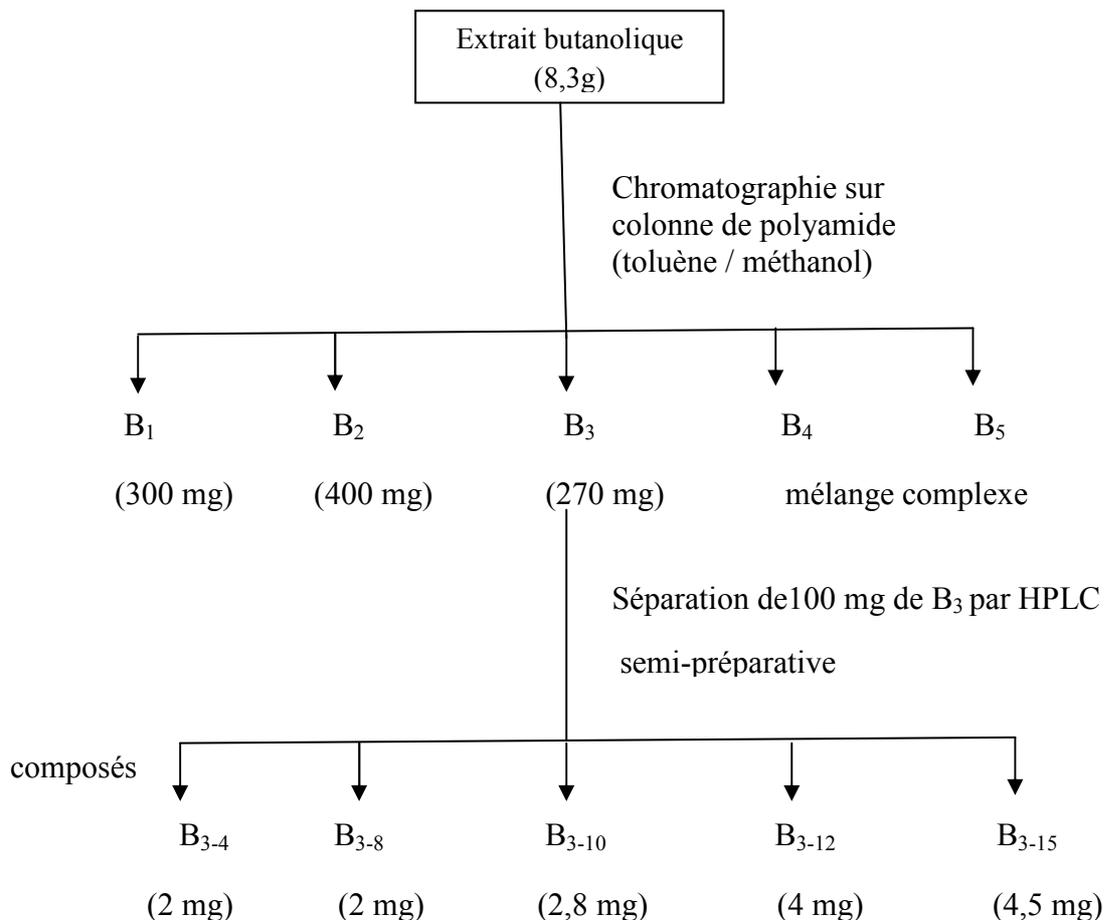


Figure-15: Récapitulatif des composés isolés par fractionnement bioguidé de la phase butanolique.

IV-3-2-Evaluation de l'activité inhibitrice de la propolis :

Cette partie de notre travail a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie médicale et de biologie moléculaire de l'université de Reims.

IV-3-2-1-Evaluation enzymologique :

La mesure de l'activité inhibitrice des propolis d'El-Malha (P₁) et de Benibelaid (P₂) est basée sur le principe de transfert d'énergie par résonance RET ou encore transfert d'énergie de fluorescence par résonance FRET (figure-16). Le substrat est constitué d'un oligopeptide comportant un groupement fluorescent (F), donneur d'énergie et un groupement éteignant (Q, pour quenching), accepteur d'énergie. Après hydrolyse, le groupement éteignant est libéré, permettant de mesurer l'augmentation de fluorescence (Huet 2001). De nombreux couples fluorescent/ éteignant ont été développés pour la mesure de l'activité enzymatique des MMPs dont le couple 7-méthoxycoumarine-4-acétyl (Mca) / dinitrophenyl-diamonopropionyl (Dnp) (Knight 1991 et 1992).

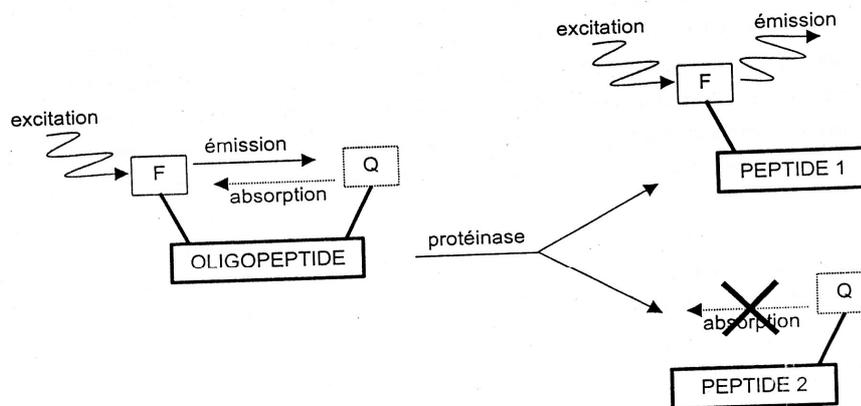
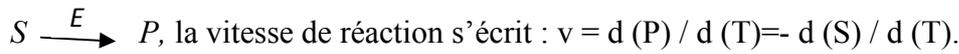


Figure-16: Représentation schématique de la mesure de l'activité enzymatique basée sur le principe d'extinction intramoléculaire.

IV-3-2-2-Mise au point de la mesure de l'effet inhibiteur des propolis sur l'activité enzymatique des MMPs à l'aide d'un spectrofluorimètre lecteur de plaque :

✓ **Principe :**

Une enzyme est une protéine capable de catalyser spécifiquement la transformation d'un ou deux substrats. En prenant un modèle simplifié de réaction enzymatique :



Pour tracer une courbe $P=f(T)$, l'enzyme E agit sur le substrat S ; le temps zéro correspond au déclenchement de la réaction. L'apparition du produit P est mesurée en fonction du temps (figure-17).

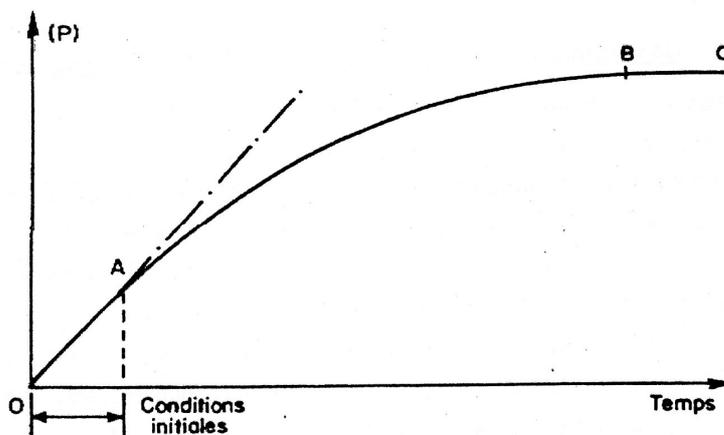


Figure-17: Courbe $P=f(T)$, relation entre l'apparition du produit et le temps.

La vitesse de réaction $v = d(P) / d(T)$ est constante pendant les conditions initiales (partie de courbe OA). Pour cette portion de la courbe, la tangente à l'origine se confond avec la courbe : la vitesse, pente de la tangente OA, est appelée vitesse initiale. Puis la vitesse diminue (portion de courbe AB) et s'annule (portion BC). La vitesse s'annule lorsque l'un des substrats est consommé ou lorsqu'un équilibre s'établit. Lorsque la vitesse d'une réaction enzymatique est déterminée, c'est toujours la vitesse initiale qui est calculée. Les mesures de vitesse sont donc faites dans les conditions initiales ou moins de 10% de la quantité du substrat est hydrolysé. Cette vitesse est proportionnelle à la concentration de l'enzyme : elle traduit donc l'activité d'une préparation de l'enzyme exprimée en unités enzymatiques. L'unité internationale (UI ou U) représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute.

✓ *Technique d'évaluation :*

✚ *Activation des MMPs :*

Les métalloprotéinases sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs. L'activation de ces pro-MMPs représente l'étape clé de la régulation de l'activité des MMPs. Elle résulte de la perte de complexation entre le soufre d'une cystéine du pro-domaine et du zinc du site catalytique. Cette activation peut se faire physiologiquement soit dans le milieu extracellulaire, soit à la surface cellulaire ou encore dans le cytoplasme.

La procédure expérimentale nécessite donc l'activation des pro-enzymes sur lesquelles l'effet de la propolis sera testé. Ces dernières sont activées par le biais de l'APMA (4-aminophenylmercuriacetate) dissoute dans la soude (NaOH à 0,1N). La concentration finale de l'APMA dans la solution est de 10 ou 20 mmol/L selon la pro-enzyme activée.

L'activation est réalisée comme suit : pour 1µl de pro-enzyme, on ajoute 0,8 µl de solution d'APMA et 6,2 µl de tampon tritest. La solution ainsi obtenue est incubée au bain marie, à 37°C pendant 1 ou 2 heures en fonction de la nature de la pro-enzyme à activer.

Le substrat (solution) est conservé à + 4°C à l'abri de la lumière. Ces substrats sont très insolubles et doivent donc être dissous dans des solvants organiques tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO). Toutefois la quantité finale de solvant dans l'essai doit être inférieure à 1% de manière à éviter tout risque de dénaturation de l'enzyme ou de modification de ses conditions.

✚ *Préparation et lecture des plaques :*

Les échantillons de propolis sont testés pour un éventuel effet inhibiteur de l'activité des MMPs. Le test est réalisé sur des microplaques noires clinitest de 96 puits dont les sites de liaison non spécifique ont été boqués à l'aide d'une solution de sérum albumine bovine (SAB) à 0,1% (P / V) dans un tampon tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5mM PH 7,5. Les propolis P1 et P2 sont testées aux concentrations allant de 10⁻⁶ à 10⁻¹⁰ g/ml (dans le DMSO). La quantité de propolis déposée par puits est 2 µl dans un volume total de 200 µl. Ce volume comprend l'échantillon testé (propolis), un tampon (généralement tritest), l'enzyme et le substrat correspondant. Ces deux derniers varient en fonction de l'enzyme testée (tableau-16). Tous les essais sont effectués en triple et des puits blancs et témoins sont intégrés aux microplaques. Les puits blancs contenant les solutions tampon et substrat permettent de vérifier l'absence d'une activité enzymatique. Les puits témoins qui contiennent l'enzyme étudiée en plus des solutions citées précédemment permettent de démontrer que l'activation de l'enzyme est correcte en absence de l'inhibiteur à tester.

Tableau-16 : Paramètres à respecter dans la préparation et la lecture des microplaques en fonction des enzymes étudiées.

Enzyme	T° réaction	Filtre excitation	Filtre émission	Gain	Qté E/ puit	Substrat	Tampon
Pro-MMP-2	T° ambiante	326 nm	465 nm	180	10 ng	M1895 2 µmol / L	Tritest
MMP-3 cat	37 °C	360 nm	465 nm	100	0,005 µmol / L	S2300 1 µmol / L	TCZ
MMP-7	T° ambiante	326 nm	465 nm	180	20 ng	M1895 2 µmol / L	Tritest
Pro-MMP-9	T° ambiante	360 nm	465 nm	140	5 ng	M1895 10 µmol / L	Tritest
MMP-14	T° ambiante	326 nm	465 nm	180	12,5 ng	M1895 2 µmol / L	Tritest
Plasmine	T° ambiante	-	405 nm	-	0,2 µg	S2231 0,3 mM	Tris HCl
Elastase leucocytaire		-	405 nm	-	8 nM	Mcosuc (Ala) ₂ 1mM	Tris HCl

La fluorescence des puits de la microplaque est mesurée sur un lecteur de plaque *HT Soft 7000* + (Perkin Elmer), aux longueurs d'ondes d'excitation et longueurs d'ondes d'émission précisées dans le tableau-18 durant 20 ou 30 minutes.

Les résultats fournis par le lecteur correspondent aux variations de fluorescence enregistrées, dépendantes de la quantité de substrat consommé par l'enzyme étudiée, et qui variera donc en fonction de la concentration de l'inhibiteur (propolis) présente dans chaque puits. Avec l'utilisation du logiciel *Excel*, les moyennes des données pour chaque temps de mesure sont réalisées. Par la suite, les courbes de la variation de fluorescence en fonction du temps pour chaque concentration de propolis sont tracées. La pente de ces courbes est alors comparée à la pente de la courbe reflétant l'évolution de la fluorescence de la solution témoin. Le rapport V_i / V_0 est ainsi obtenu. Ces données permettront de déterminer par analyse de régression non linéaire les IC_{50} et éventuellement les K_i grâce au logiciel *Grift Computer Software*.

En plus de leur effet sur l'activité des MMPs, les propolis P₁ et P₂ sont testées pour un éventuel effet inhibiteur de l'activité de la plasmine et de l'élastase leucocytaire. La technique utilisée est semblable à celle des MMPs à l'exception des plaques (plaque transparente clinitest de 96 puits), du filtre (excitation et émission) et du gain. Les activités enzymatiques de la plasmine et de l'élastase leucocytaire sont mesurées par l'hydrolyse des substrats spécifiques S2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) (pNA, para-nitroanilide) et N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNA. La cinétique de libération du para-nitroaniline est suivie par mesure de l'absorbance à 405 nm.

IV-3-3-Influence de la propolis sur l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine par les fibroblastes du derme humain en culture :

IV-3-3-1- En absence d'UV-A :

IV-3-3-1-1-Activation de la pro-MMP-3 par la plasmine :

➤ *In vitro :*

125 nM de pro-MMP-3 sont incubés avec 65 nM de plasmine en absence et en présence des effecteurs (extraits de propolis) aux concentrations de 0,5-1 µg/ml dans un tampon tris HCl 50 mM NaCl 150 mM CaCl₂ 5 mM PH 7,5 pendant 4 H à 37°C. La réaction est arrêtée par addition d'aprotinine (1 mg / ml). Des témoins pro-MMP-3 en présence et en absence de plasmine et d'aprotinine sont aussi testés. Les échantillons sont ensuite soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 10% (P/V) en présence de dodécyl sulfate de sodium en vue de séparer les différentes protéines.

➤ *Ex vivo :*

Pour nos essais ex vivo nous avons utilisé des fibroblastes dermiques humains normaux. Ces cellules s'apparentent à des cellules de type inflammatoire par leurs capacités à migrer, à proliférer, à s'attacher, à synthétiser et à dégrader des molécules du tissu conjonctif et à maintenir l'intégrité tissulaire (Brassart 2000 thèse). Les fibroblastes, cellules qui prédominent dans les tissus conjonctifs (65%), synthétisent certains éléments de ce tissu comme les collagènes de type I et II, les protéoglycanes...etc. Cette matrice spécifique leur permet en retour de maintenir leur caractère différencié. Les fibroblastes synthétisent aussi des protéases intervenantes dans le catabolisme et le renouvellement de certains constituants du tissu conjonctif (MMP-1, MMP-2....).

Le fibroblaste se distingue de beaucoup de types cellulaires par sa capacité à conserver sa morphologie en culture. A confluence, le phénomène d'inhibition de contact contraint les fibroblastes en culture à limiter leur prolifération et à constituer une monocouche cellulaire, caractéristique des lignées fibroblastiques normales.

✚ Culture des fibroblastes :

Les fibroblastes congelés dans le milieu de culture avec 20% (V/V) de sérum de veau fœtal (SVF) et 10% (V/V) de diméthylsulfoxyde (DMSO) sont fournies par le laboratoire de biochimie médicale et de biologie moléculaire de l'université de Reims.

Les souches de fibroblastes dermiques humains (FDH) sont établies à partir d'explants de biopsies de peau d'adultes sains après avoir recueilli leur consentement (âge : 47 ans). Les FDH sont cultivés dans du milieu minimal essentiel d'Eagle modifié par Dubelco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 200 U/ml pénicilline, 50 U/ml streptomycine et 2 mM glutamine, à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les milieux de culture sont changés deux fois par semaine. Le stade de confluence (après 7-8 jours de culture) est obtenu quand la totalité du support disponible est occupée, la prolifération cellulaire est alors limitée par l'inhibition de contact.

✚ Obtention de sous culture par trypsinisation :

Après confluence (saturation des boîtes) nous procédons à un « passage ». Les cellules sont rincées avec un tampon de phosphate de sodium (PBS) afin d'éliminer toute trace de sérum (un inhibiteur sérique peut enrayer l'action de la trypsine). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C en présence de 0,05% de trypsine.

La trypsine permet de détacher les fibroblastes de leur support. Après libération des cellules, le SVF est ajouté pour stopper l'action de la trypsine. Les cellules sont alors centrifugées à 500 tours pendant 5 minutes puis diluées dans du milieu de culture contenant 10% (V/V) de SVF.

Après numération sur une cellule de Neubauer, la suspension cellulaire est distribuée dans de nouveaux flacons de culture. Les fibroblastes dermiques utilisés dans les différentes expériences sont compris entre le 5^{ème} et 10^{ème} passage.

✚ Ensemencement et culture en monocouche :

Les FDH sont cultivés jusqu'à 80% de confluence dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal SVF dans des plaques de 6 puits (5. 10⁵ cellules/ puit). Les plaques sont incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée contenant 5% (V/V) de CO₂ pendant une nuit. Cette étape permet l'adhésion des cellules. Les cultures sont ensuite rincées deux fois avec un tampon phosphate PBS (10 mM de phosphate de sodium, 170 mM de NaCl PH 7,4) et incubées pendant 24 heures dans un milieu sans sérum en absence ou en présence de 10 µg/ml de propolis (fraction et produits isolés) et de 20 µg/ml de plasminogène. Le milieu de culture est ensuite récupéré (après 24 heures d'incubation). La génération de la MMP-3 active est ensuite analysée par Western blot.

IV-3-3-1-2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium :

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium PAGE-SDS selon la méthode décrite par Laemmli 1979. Les échantillons sont mis en suspension dans du tampon échantillon (Tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1% (P/V), APS 0,05% (P/V), TEMED 0,05% (V/V) PH 8,8). Le gel est alors soumis à un courant de 10 mA pendant 30 minutes puis de 20 mA pendant 90 minutes (tampon de migration : Tris 25 mM, SDS 0,1% (P/V), glycine 192 mM PH 8,3).

➤ ***Electrotransfert et immuno-révélation des protéines :***

La révélation des protéines en PAGE-SDS est réalisée par la technique de Western blot selon les techniques décrites par Towbin et *al* 1979.

Après migration, le gel est équilibré pendant 30 minutes dans un tampon de transfert (Tris HCl 48 mM, glycine 39 mM, méthanol 20%, SDS 1,3 mM, qsp 1L d'eau distillée). Dans le même temps, la membrane de PVDF (difluore de polyvinyl) est activée 15 secondes dans le méthanol, réhydratée pendant 5 minutes dans l'eau distillée puis équilibrée dans le tampon de transfert. Les protéines sont ensuite transférées du gel vers la membrane PVDF pendant 45 minutes sous un voltage constant de 100 V. Afin de vérifier le transfert des protéines sur la membrane, celle-ci est trempée 15 secondes dans le méthanol afin de fixer les protéines, séchées puis colorées avec une solution de rouge ponceau.

➤ ***Immunomarquage et révélation :***

La membrane est réactivée 15 secondes dans le méthanol, réhydratée 5 minutes dans l'eau et rééquilibrée 10 minutes dans une solution de TBS-T PH 7,5 (Tris Buffer Saline-Tween 20 : Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M). Elle est ensuite bloquée pendant une nuit à 4°C dans une solution de TBS-T contenant 5% de SAB, afin de saturer les sites non spécifiques. Après blocage la membrane est incubée pendant 2 heures sous agitation dans une solution d'anticorps primaire (anti-MMP-3), diluée à 1/1000 dans du TBS-T 1%. Cette étape est suivie de trois lavages de 10 minutes avec du TBST, d'une incubation d'une heure avec une solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (TBST-BSA 1%), et de plusieurs lavages avec les tampons TBST, puis TBS. La révélation s'effectue par autoradiographie, à l'aide d'un kit de détection chimiluminescence (ECLTM western blotting detection reagent) et de film photographique (hyperfilmTM ECL).

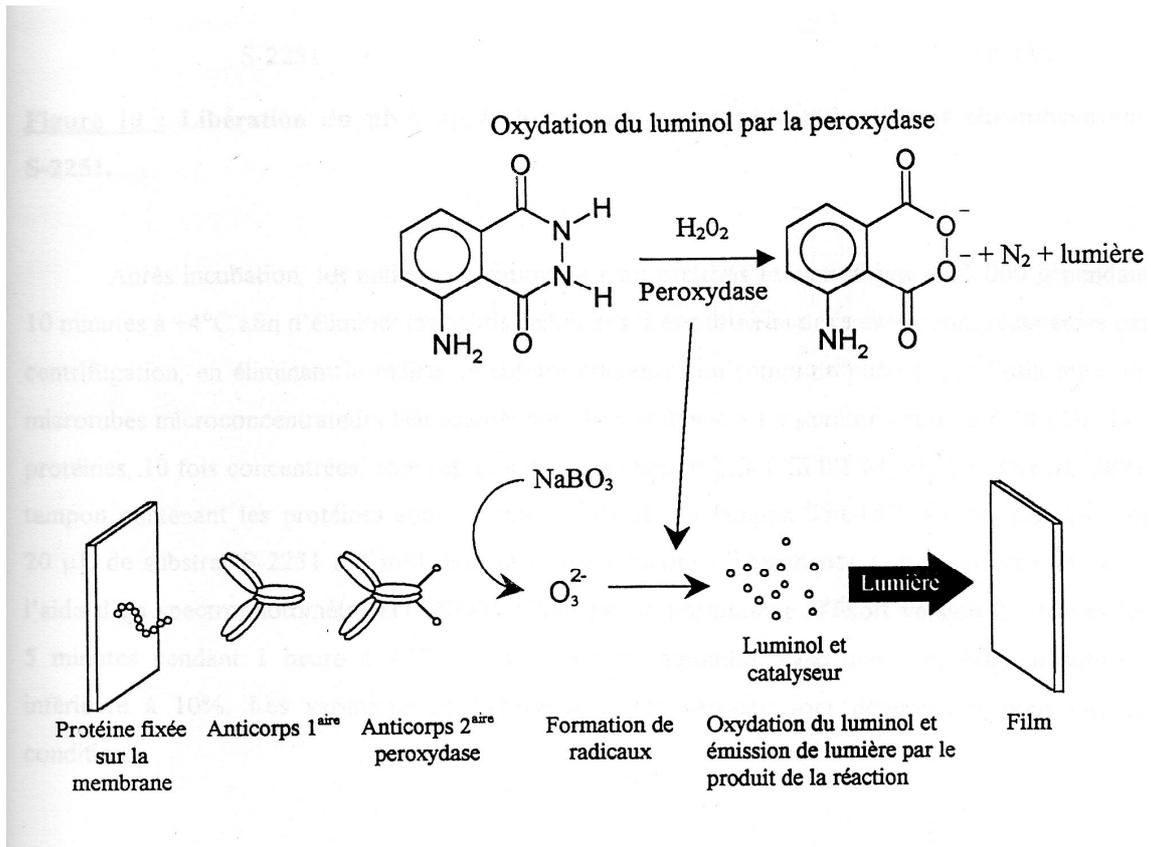


Figure-18: Schéma général de la révélation des protéines par chimiluminescence (Brassart 2000).

IV-3-3-2- En présence d'UV-A :

L'exposition au soleil peut induire des effets rapides et profonds sur l'organisme. On parle alors de réaction aigüe. Ceci englobe la réaction inflammatoire et les événements immunologiques qui en découlent. La photosensibilité et les brûlures conduisent à la formation d'érythème et d'œdèmes. Il se produit également des effets à long terme qui ont pour conséquences le vieillissement et les cancers cutanés.

Le vieillissement photo-induit se caractérise par l'élastose, un défaut de la matrice extracellulaire du derme lié à la synthèse anormale de collagènes. Ces altérations des structures, des fonctions et de l'apparence de la peau sont dues à la libération de radicaux libres oxygénés et à la surexpression et à la suractivation des MMPs (Cauchard et Hornebeck 2004).

Le développement des sociétés et l'épanouissement des différentes populations ainsi que le développement de l'information (surtout les médias) ont permis à monsieur tout le monde de connaître les dommages de l'exposition au soleil. Cette situation à entraîner une augmentation de l'utilisation des produits anti-rides ou plus généralement anti-âges. Si

actuellement de nombreux actifs anti-âges sont commercialisés en cosmétique, aucun d'entre eux n'agit sur l'activité des MMPs.

De nombreuses études réalisées sur des fibroblastes dermiques en culture ont montré que l'irradiation UV entraîne une augmentation de l'expression des MMPs particulièrement les MMP-1 et MMP-3 (Ramos-Desimone *et al* 1999, Brennan *et al* 2003). La MMP-3 est une enzyme clé qui intervient dans l'activation d'autres MMPs comme la MMP-1 et MMP-9 à travers une cascade protéolytique (Huet *et al* 2004). Le but de notre travail est d'évaluer l'effet de la propolis (fraction et produits isolés) sur l'expression de la MMP-3 après exposition aux rayonnements ultraviolets (UV-A) au niveau de fibroblastes humains dermiques en culture.

- ***Culture des cellules :***

Les cultures de fibroblastes dermiques humains sont établies à partir d'explants de biopsie d'adultes sains après avoir recueilli leur consentement (âge : 47 ans). Les FDH sont cultivés dans un milieu minimal d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 200 U/ml de pénicilline, 50 U/ml de streptomycine et 2 mM de glutamine, à 37 °C en présence de 5% (V/V) de CO₂. Les FDH sont utilisés entre le 5^{ème} et le 10^{ème} passage.

Les FDH sont cultivés jusqu'à 80% confluence dans le DMEM contenant 10% de SVF dans des plaques de 6 puits à raison de 5. 10⁵ cellules / puit. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée contenant 5% (V/V) de CO₂ pendant 1 nuit pour permettre l'adhésion des cellules.

- ***Irradiation UV :***

Après confluence (24H d'incubation), le milieu de culture est éliminé. Les cultures sont ensuite rincées deux fois avec le PBS. Avant l'irradiation, les cellules sont placées dans 2 ml de PBS puis exposées à 10 J / cm² d'UVA pendant 30 minutes à 37°C dans un appareil *Vilbert Lourmat*. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec le PBS puis incubées pendant 24 heures dans un milieu sans sérum en absence et en présence de 10 µg/ml de propolis (fraction et produits isolés). La plaque témoin, non soumise aux UV-A est traitée dans les mêmes conditions. Les cellules sont placées dans du PBS, puis laissées sous la hotte à flux lumineuse le temps de l'irradiation. Le PBS est ensuite remplacé par du milieu DMEM sans SVF. Enfin, les deux plaques sont incubées 24 heures à 37°C. Le milieu de culture est récupéré et centrifugé à 500 tours pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires.

Après dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford 1976) l'expression de la MMP-3 au niveau des milieux conditionnés est analysée par Western blot. La méthode

de Bradford est une technique basée sur la variation de couleur du bleu de Coomassie G-250 par l'interaction à différente concentration de protéines. 10 µl d'échantillon sont mélangés avec 790 µl d'eau distillée et 200 µl de réactif Bio-Rad Protein Assay. Après agitation, les échantillons sont incubés 15 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 595 nm. La concentration en protéines des différents milieux est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage réalisée en parallèle avec de l'albumine bovine.

IV-3-3-3- En présence de kappa-élastine:

Le tissu conjonctif participe au maintien des fonctions vitales de l'organisme. Il est composé de cellules et de matrice extracellulaire. La protéolyse de la matrice extracellulaire est un phénomène observé au cours de l'invasion cellulaire, de l'inflammation ou au cours des maladies dégénératives liées au vieillissement (oséoartrrose, athéro-artériosclérose).

Les enzymes protéolytiques impliquées ont été identifiées. Ces enzymes appartiennent à 4 classes de protéases : sérine, cystéine, aspartyl et métalloprotéinases. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les sérines protéinases du système plasminogène/plasmine ont été les plus étudiées (Dano *et al* 1999). L'activation des MMPs entraîne la dégradation des composants extracellulaire et génère des peptides capables de régler l'activité cellulaire. La fixation de ces peptides à la surface des cellules est responsable d'importants effets biologiques différents de ceux produits par les protéines intactes. Les propriétés de ces peptides libérés ont donné naissance au concept « matrikine » (Maquart *et al* 1999). L'élastine, une des protéines de la matrice extracellulaire est retrouvée en quantité importante dans de nombreux tissus comme les poumons, la peau et également l'endothélium vasculaire. La dégradation de cette protéine par des enzymes spécialisées, nommées élastases, entraîne la libération de peptide d'élastine dans l'espace extracellulaire. De nombreuses études ont montré que ces peptides sont capables de moduler plusieurs activités cellulaires et méritent donc le nom de matrikine (Fulop *et al* 1998).

Des études relativement récentes ont montré l'influence de ces peptides dérivés de l'élastine sur différents types cellulaires (monocytes, lymphocytes, cellules musculaires lisses, fibroblastes et cellules cancéreuses). Les travaux de Brassart *et al* 2001 ont montré que les peptides d'élastine et plus particulièrement la kappa-élastine stimule l'expression des MMPs telles que la MMP-1 et la MMP-3 au niveau des fibroblastes du derme humain en culture. Dans cette partie de notre travail nous avons étudié l'effet de la propolis (fraction active et produits isolés) sur l'expression de la MMP-3 après stimulation de son expression par la kappa-élastine, peptide dérivé de l'élastine.

- ***Culture cellulaire et traitement :***

Les FDH sont cultivés jusqu'à 80% de confluence dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) dans des plaques de 6 puits ($5 \cdot 10^5$ cellules/ puit). Les plaques sont incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée contenant 5% (V/V) de CO₂ pendant une nuit.

Après confluence, le milieu de culture est éliminé. Les cultures cellulaires sont ensuite rincées deux fois avec du PBS et incubées pendant 24 heures dans un milieu sans sérum contenant 50 µg/ml de kappa-élastine en absence ou en présence de 10 µg/ml de propolis (fraction et produits isolés). Le milieu de culture est ensuite récupéré. Enfin, la génération de la MMP-3 active est analysée par Western blot.

Références :

- Atungulu, A., Miura, M., Atungulu, E., Satou, Y., Suzuki, K (2007). Activity of gaseous phase steam distilled propolis extract on peroxidation and hydrolysis of rice lipids. *Journal of Food Engineering* **80**, 850-858.
- Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C., Popov, S (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch* **50c**, 167–172.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M. C (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* **70**, 190-193.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Pureb, O., Bocari, G (1994). Volatile constituents of propolis. *Z. Naturforsch* **49**, 6-10.
- Barral, G., Barral, D (1992). Propolis ointment with vaseline. *Pers. Communication*.
- Borcic, I., Radonic, A., Grzunov, K (1998). Comparaison of the volatile constituents of propolis gathered in different regions of Croatia. *Flavor and Fragrance Journal* **11**, 311-313
- Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dy binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brassart, B., Fuchs, P., Huet, E., Alix, A. J. P., Wallach, J., Tamburro, A. M., Delacoux, F., Haye, B., Emonard, H., Hornebeck, W., Debelle, L (2001). Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up regulation by elastine peptides in cultured fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **7 (276)**, 5222-27.
- Brassart, B. Influence des peptides dérivés de l'élastine sur les expressions des métalloprotéinases matricielles par les fibroblastes dermiques humains et les cellules issues de fibrosarcome humain en culture 2000. Thèse de doctorat. Université de Reims.
- Brennan, M., Bhatti, H., Nerusse, K. C., Baghavathula, N., Kang, S., Fisher, G. J., Verani, J., Voorhees, J. V (2003). Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagene damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol* **78**, 43-8
- Cauchard, J. H., Hornebeck, W (2004). Vieillissement les enzymes gloutonnes de la peau. *Vivant 5: Vieillissement, peau et métalloprotéinases*. 01/10/04.
- Combier, H (1968). Thèse. Université Claude Bernard. Lyon .
- Dano, K., Romer, J., Nielson, B. S., Bjorn, S., Pyke, C., Rygaard, J., Lun, L. R (1999). Cancer invasion and tissue remodeling **107**, 102-27.
- Drago, L., Mombelli, B. D. E., Vacchi, E., Fassina, M. C., Tocalli, L., Gismondo, M. R (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemother* **12 (5)**, 390-5.
- Francisco A Tomas-Barberan., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Thomas-

- Lorente, F (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochem* **1 (34)**, 191-196.
- Fulop, T. J., Jacob, M. P., Khalil, A., Wallach, J., Robert, L (1998). Biological effects of elastin peptides. *Pathol Biol* **46**, 497-506.
- Grange, J. M, Davey, R. W (1990). Antibacterial properties of propolis. *Journal of The Royal Society of Medecine* **83**, 159-160.
- Hassan, A (1976). Contribution à l'étude biochimique de trois représentants de la tribue des lotées. *Dorycnium* Vill, *Bonjeania leichenb*, *Lotus.L* (légumineuses). Thèse de doctorat (3^{ème} cycle). Lyon.
- Huet, E. Contrôle des cascades protéolytiques (système plasminogène/ plasmine et métalloprotéinases matricielles) impliquées dans la progression tumorale: stimulation par les peptides d'élastine et inhibition par l'acide oleique. Thèse de doctorat. Université de Reims 2001.
- Huet, E., Cauchard, J. H., Berton, A., Robinet, A., Decarme, M., Hornebeck, W., Bellon, G (2004). Inhibition of plasmin-mediated prostromelysin-1 activation by interaction of long chain unsaturated fatty acids with kringle 5. *Biochem Pharmacol* **67**, 643-654.
- Keskin, N., Selc, U. K., Hazin, Hüsnücan Baser, K., Mine Kürkc Uoglu (2001). Antibacterial and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch* 56c: 1112-1115.
- Knight, C. G (1991). A quenched fluorescent substrat for thimet peptidase containing a new fluorescent aminoacid, DL-2-amino-3-(7-methoxy-4-coumaroyl)propionic acid. *Biochemistry Journal* **274**, 45-48.
- Knight, C. G (1992). A novel coumarin labeled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS letters* **296**, 263-266.
- Laemmli, U. K (1979). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci* **76**, 4350-4354.
- Maquart, F. X., Simeon, A., Pasco, S., Monboisse, J. C (1999). Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracellulaire: le concept de matrikine. *J Soc Biol* **193**, 423-28.
- Marcenac, L. N (1974). *Chirurgie générale vétérinaire*. Edition Maloine. Paris. p 357, 359.
- Marcucci, M. C (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83-99.
- Melliou, E., Stratis, E., Chinou, I (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-Antimicrobial activity. *Food Chem* **103**, 375-380.

- Melpomeni, P., Brem, H., Ehrlich, P., Zhang, J. G., Cai, W., Li, Z., Croitoru, A., Thang, S., Vlassara, H (2003). Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes* **52**, 2805-2813.
- Merseta, L., Meresta, T (1985). An attempt to use propolis extract in the treatment of mastitis of cow. *Medecyna Weterynaryjna* **41**, 489-492.
- Park, Y. K., Ikegaki, M (1998). Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparation. *Biosc Biotechnol Biochem* **62**, 2230-2232.
- Park, Y. K., Ikegaki, M., Matias of Alencar, S (2000). Classificação das propolis Brasileiro a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*: 58.
- Park, Y. K., Matias of Alencar, S., Zima of Ajenar, C., Scamparini, A. R. P., Ganzalez, M., Maria, A. A (2001). Comparação Das características físico-químicas das propolis produzidas na região sub-tropical da América do Sul: Evidência fitoquímica de sua origem botânica. *Mensagem Doce* 61.
- Ramos-De Simone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L., Quingley, J (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin / stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* **274**, 13066-13076.
- Ribeira de Rezende, G. P. S., Pimenta, F. C., Sucaras de Costa, L. R. R (2006). Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. *Braz J Oral Sci* **5 (16)**, 967-970.
- Shub, T. A., Kagramonova, K. A., Kivman, G. Y. A., Tikhonov, A. I., Gritsenko, V. I (1978). Antimicrobial activity of propolis extracts. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **11**, 1242-1244.
- Silici, S., Kutluca, S (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* **99**, 69-73.
- Soares Torres, R. N., Dantas lopes, J. A., Moita Neto, J. M., Das Graças Lopes Cito, A. M (2008). Constituintes Voláteis de Propolis piauiense. *Quim Nova* **31**, 479-485.
- Subramoniam, A., Evans, D. A., Rajasekharan, S., Sreekandan nair, G (2001). Effect of *Hemigraphis Colorata* (Blume): hairy leaf on wound healing and inflammation in mice. *Indian journal of pharmacology* **33**, 283-285.
- Tichy, J., Novak, J (2000). Detection of antimicrobial in bees products with activity against viridans streptococci. *J Altern Complement Med* **6 (5)**, 383-9.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J (1970). Electrophoretic transfer of proteins from bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.

-Ugur, A., Arslan, T (2004). An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Med Food* **7**, 90-94.

-Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R (1980). High-performance liquid, gas-liquid and thin-layer Chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. *J Chromatogr* **187**, 255-260.

Chapitre-V :

Résultats et discussion

V-1-Etude comparative de quelques propolis de l'Est Algérien :

V-1-1-Etude de l'activité antibactérienne :

La propolis a un aspect hétérogène. Elle est constituée de pièces de différents volumes, de couleur noir-brun pour celle d'El-malha et Kaous et jaune pour celle de Benibelaïd et Jamaa. Elle est d'une consistance rigide et d'une odeur agréable. Après extraction la propolis est molle et malléable.

V-1-1-1-Résistance des souches testées :

Les résistances des souches étudiées sont rapportées ci-dessous :

- *S. aureus* a une résistance homogène aux bêta-lactamines. Cette résistance est associée aux aminosides mais aussi à d'autres antibiotiques comme la fosfomycine.
- *K. pneumoniae*, mise à part les résistances naturelles (ampicilline et ticarcilline), est résistante à l'augmentin.
- *P. mirabilis* est résistant aux : thrimétoprine-sulfaméthoxazole, acide nalidixique, ticarcilline, amoxicilline et la péfloxacin.
- *P. aeruginosa* est intermédiaire à la péfloxacin.

Les streptocoques testés sont caractérisés par leurs résistances à plusieurs antibiotiques :

- Le streptocoque α hémolytique est résistant à la pénicilline, l'érythromycine, le thrimétoprine-sulfaméthoxazole et à la fosfomycine.
- Le streptocoque non hémolytique est résistant aux : érythromycine, spiramycine, et au thrimétoprine-sulfaméthoxazole.

V-1-1-2-Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé :

Les disques imprégnés de 100 μ l d'extrait éthanolique des propolis 1, 2, 3 et 4 éthanol à 60%, 70%, 80% et 95% sont testés par la méthode NCCLS pour les souches de référence (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC 27853) ainsi que les souches isolées des différents prélèvements. Les diamètres d'inhibition sont représentés dans les tableaux 17 et 18.

Tableau-17: Diamètres d'inhibition des propolis 1 et 2 pour les souches étudiées

SOUCHE	EEP (1)				EEP (2)			
	60 %	70 %	80 %	95 %	60 %	70 %	80 %	95 %
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	20	24	30	28	18	20	24	22
<i>E. coli</i> ATCC 25922	< 6	10	24	22	< 6	8	14	12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	< 6	12	12	12	< 6	10	10	10
<i>S. aureus</i>	15	20	24	22	12	16	20	18
Streptocoque β hémolytique	12	18	20	20	16	18	18	18
Streptocoque α hémolytique	8	8	12	12	8	8	8	8
Streptocoque non hémolytique	18	20	22	22	16	18	20	20
<i>E. coli</i>	< 6	8	10	10	< 6	8	10	10
<i>P. aeruginosa</i>	< 6	8	10	10	< 6	8	10	10
<i>P. mirabilis</i>	10	10	12	12	10	10	12	12
<i>K. pneumoniae</i>	8	10	10	10	7	10	10	10

< 6 : absence de diamètre

EEP (1): Extrait Ethanolique de la Propolis d'El-malha

EEP (2): Extrait Ethanolique de la Propolis de Benibelaid

NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulations.

Tableau-18: Diamètres d'inhibition des propolis 3 et 4 pour les souches étudiées.

SOUCHE	EEP (1)				EEP (2)			
	60 %	70 %	80 %	95 %	60 %	70 %	80 %	95 %
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	20	26	28	28	18	20	24	22
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14	16	16	16	< 6	8	14	12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	12	12	12	< 6	10	10	10
<i>S. aureus</i>	20	22	24	24	20	24	24	26
Streptocoque β hémolytique	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptocoque α hémolytique	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptocoque non hémolytique	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	12	14	14	16	12	14	14	14
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	12	12	14	14	12	14	16	16
<i>K. pneumoniae</i>	8	10	12	12	10	12	14	14

< 6 : absence de diamètre

EEP (3): Extrait Ethanolique de la Propolis de Kaous.

EEP (4): Extrait Ethanolique de la Propolis de Jamaa.

NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulations.

La variation du diamètre d'inhibition des propolis testées en fonction du pourcentage d'éthanol utilisé vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 est représentée dans la figure-19.

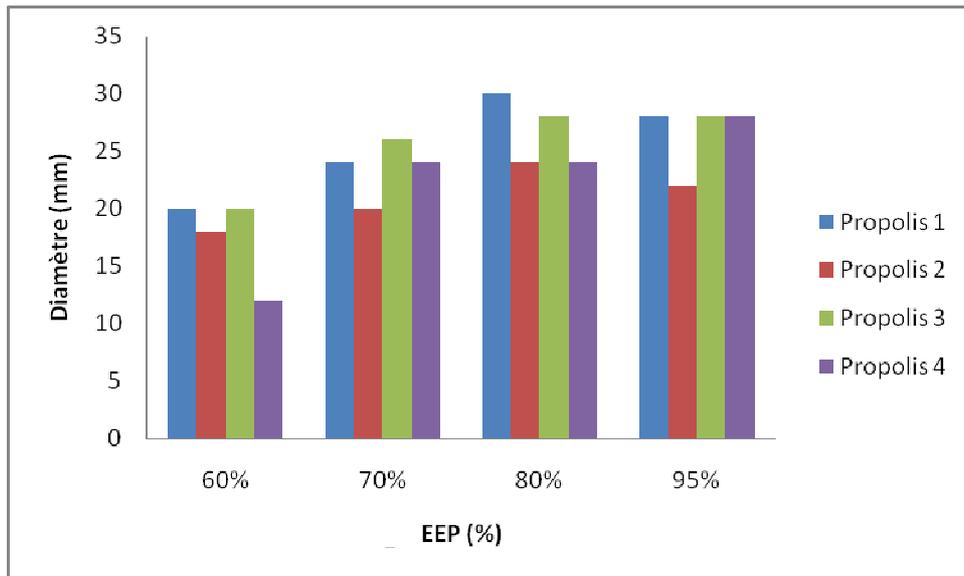


Figure-19 : variation du diamètre d'inhibition en fonction du pourcentage d'éthanol vis à vis de *S. aureus* ATCC 25923.



Photo-5: Diamètre d'inhibition de la propolis 1 pour *S. aureus* ATCC 25923.



Photo-6: Diamètre d'inhibition de la propolis 2 pour *S. aureus* ATCC 25923.



Photo-7 : Diamètre d'inhibition de la propolis 1 pour *E. coli* ATCC 25922.



Photo-8: Diamètre d'inhibition de la propolis 2 pour *E. coli* ATCC 25922.

L'éthanol entre dans la composition de plusieurs préparations thérapeutiques (Brehon et al 2000). Il s'évapore facilement et solubilise les composants actifs de la propolis (Krell 1996). Son efficacité dans l'étude de l'activité antibactérienne est confirmée (Drago et al 2000, Park et al 2002, Rhajaoui et al 2001...). C'est pour ces raisons que nous avons utilisé l'éthanol (à différents pourcentages) comme solvant pour l'étude de l'activité antibactérienne.

Les EEP à 60%, 70%, 80% et 95% d'éthanol touchent toutes les souches bactériennes testées. Nous constatons que les EEP éthanol à 80% et 95% donnent les diamètres les plus importants pour *S. aureus* ATCC 25923 (30 mm pour la propolis 1, 28 mm pour la propolis 3 et 24 mm pour les propolis 2 et 4) et le streptocoque β et non hémolytique. De plus, nous remarquons que les zones d'inhibitions de la propolis 1 sont plus grandes que celles des propolis 2, 3 et 4. Nous remarquons que *S. aureus* isolée du prélèvement pathologique et présentant une résistance homogène aux bêta-lactamines, associée à une résistance aux aminosides, à la fosfomycine, présente des diamètres assez importants pour la propolis (24 mm pour les propolis 1, 3 et 4 et 20 mm pour la propolis 2).

D'une manière générale, tous les EEP des propolis testées inhibent les souches étudiées et entraînent des diamètres qui varient en fonction de l'origine de la propolis (Elmalha et Benibelaïd), de l'espèce considérée et du pourcentage d'alcool utilisé.

L'utilisation de l'EEP à différents pourcentages d'éthanol par la méthode des disques montre que le diamètre d'inhibition de la propolis dépend de sa solubilité dans le solvant et par conséquent de sa diffusion dans le milieu. Ce phénomène est signalé dans la littérature par Tabera et al 2000. Les diamètres obtenus indiquent que les composants actifs de la propolis sont plus solubles dans l'éthanol à 80 %. Ces composants sont probablement les flavonoïdes que nous avons détectés par analyses chimiques. Ces composants seraient impliqués selon la littérature dans l'effet antibactérien de la propolis (Kujumgiev et al 1999, Rhajaoui et al 2001...). Nos résultats, concernant l'effet d'inhibition de la croissance bactérienne de la propolis pour : *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* et le streptocoque β hémolytique, sont en accord avec ce que rapporte la littérature (Abdusalam et al 1989, Drago et al 2000, Keskin et al 2001, Koo et al 2000...).

Nos propolis testées sont faiblement actives sur : *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *P. mirabilis*. Les diamètres d'inhibition varient de 10 à 16 mm. La propolis 4 est plus active sur ces bactéries. Ces diamètres d'inhibition sont de 14 mm pour *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* et 16 mm pour *P. mirabilis*. Nos résultats sont en désaccord avec la littérature (Drago et al 2000, Keskin et al 2001, Koo et al 2000...) qui ne signale aucune action de la propolis sur ces germes.

Nous avons comparé l'activité antibactérienne de nos propolis (1, 2, 3 et 4) sur tous les germes testés. Nos résultats montrent que : à l'exception de *E. coli* ATCC 25922 pour laquelle les diamètres d'inhibition de la propolis 1 sont importants, nos propolis sont plus actives sur *S. aureus* et les streptocoques (β et non hémolytiques). Par contre, elles sont peu actives sur les bacilles à Gram négatif étudiés. Nos propolis ont donc, une activité contre les cocci à Gram positif essentiellement. Ces propolis agissent comme certaines familles d'antibiotiques à spectre étroit. Dans notre cas, il s'agit des macrolides (antibiotiques à spectre étroit, actif sur les cocci à Gram positif essentiellement).

Nos tests montrent que la propolis est très active sur le streptocoque β hémolytique, germe le plus incriminé au cours des angines rouges. De ce fait, nous pensons que son utilisation comme adjuvant du traitement antibiotique peut activer la guérison.

V-1-1-3-Détermination des CMI :

Les valeurs des CMI des propolis (1) et (2) figurent dans le tableau-19.

Tableau-19: Valeurs des CMI des propolis 1 et 2.

CMI en $\mu\text{g/ml}$	Propolis (1)	Propolis (2)
Souche		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	40	60
<i>E. coli</i> ATCC 25922	100	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	100	1100
<i>S. aureus</i>	80	200
Streptocoque α hémolytique	200	>1400
Streptocoque β hémolytique	60	600
Streptocoque non hémolytique	200	600
<i>E. coli</i>	100	1000
<i>P. aeruginosa</i>	100	1100
<i>P. mirabilis</i>	100	1200
<i>K. pneumoniae</i>	100	1200

Propolis (1) : propolis d'El-malha.

Propolis (2) : propolis de Benibelaïd.

NB : pour chaque souche testée la CMI est déterminée 3 fois pour nous assurer du critère de reproductibilité.

Nous avons déterminé les CMI des propolis 1 et 2 vis-à-vis des souches de références et des germes isolés à partir de prélèvement pathologique. Les CMI sont ensuite comparées. Pour *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, le streptocoque β hémolytique, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* et *K. pneumoniae* : la CMI de la propolis 1 est 10 à 12 fois plus importante que celle de la propolis 2. Nous pensons que cette différence est due à la présence en concentration plus importante du principe actif dans la propolis 1.

La comparaison entre les valeurs des CMI de la propolis et les résistances des bactéries vis à vis des antibiotiques que nous avons testés montre que :

✓ *Pour les bactéries à Gram positif :*

La CMI de la propolis 1 pour le streptocoque β hémolytique, sensible aux antibiotiques testés, est de 60 $\mu\text{g} / \text{ml}$; alors que pour les streptocoques α et non hémolytiques résistants à plusieurs antibiotiques, la CMI est 3 fois plus grande (200 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Pour la propolis 2 les streptocoques β et non hémolytiques ont une CMI de 600 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Par contre, le streptocoque α hémolytique persiste jusqu'à 1400 $\mu\text{g} / \text{ml}$. La souche de référence de *S. aureus* a une CMI de 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Cette valeur est 2 à 3 fois plus grande pour la souche isolée à partir du prélèvement pathologique. Les CMI de *S. aureus* (souche de référence et souche isolée de prélèvement pathologique) sont les plus petites comparées aux autres bactéries testées.

On remarque qu'il existe une relation entre les valeurs des CMI de la propolis et le niveau de résistance aux antibiotiques des germes testés. Une souche sensible aux antibiotiques l'est aussi pour la propolis. Une souche résistante pour les antibiotiques l'est aussi pour la propolis.

✓ *Pour les bactéries à Gram-négatif :*

On note qu'il existe une différence entre les deux propolis. La propolis 1, beaucoup plus active, agit de la même manière sur toutes les bactéries à Gram négatif alors que la propolis 2 agit en fonction de l'espèce bactérienne. Les CMI sont de 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *E. coli*, 1100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *P. aeruginosa*, 1200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *P. mirabilis* et *K. pneumoniae*.

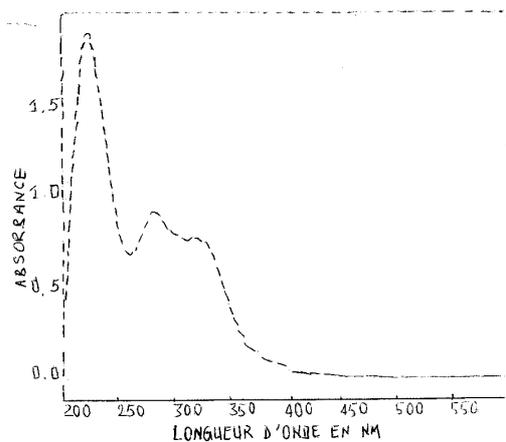
La comparaison des valeurs des CMI de la propolis algérienne avec d'autres propolis montre que la propolis algérienne est plus active sur *S. aureus* et *E. coli* que la propolis d'Egypte pour laquelle on retrouve des CMI de 2200-2600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *S. aureus* et 1460-1600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *E. coli* (Hegazi et Abd El Hady 2002), de l'Uruguay et de Chine pour lesquelles on retrouve des CMI de 80-100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *S. aureus* et 800-1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *E. coli*. Elle est plus active aussi sur *P. mirabilis* et *K. pneumoniae* que la propolis du Maroc

pour laquelle on retrouve des CMI de 124 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *P. mirabilis* et 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pour *K. pneumoniae* (Rhajaoui et al 2001).

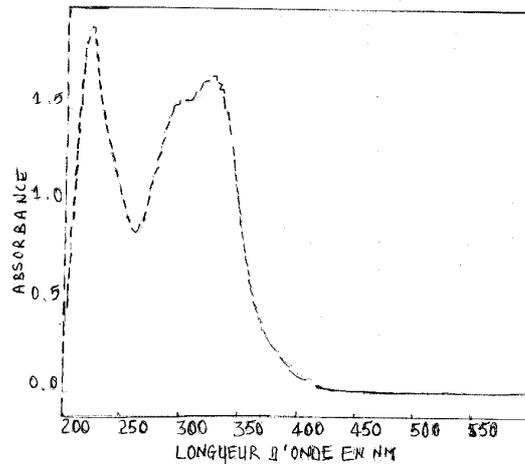
V-1-1-4- Etude du profil chimique :

V-1-1-4-a-Spectre d'absorption UV-visible :

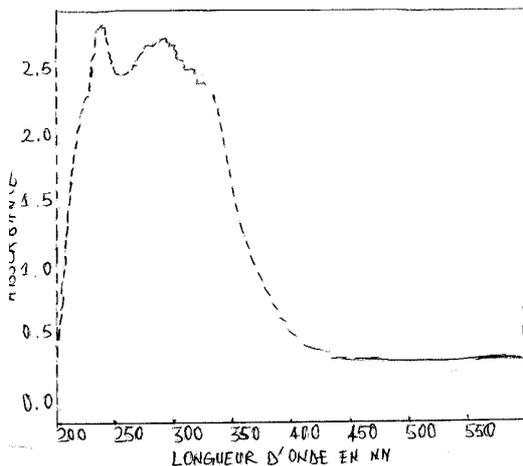
Les spectres UV-visible des 4 propolis présentent 2 pics d'absorption qui correspondent aux bandes I (entre 300 et 385 nm) et II (entre 300 et 385 nm) des flavonoides. Les spectres d'absorption UV-visible des 4 propolis sont représentés dans la figure-20.



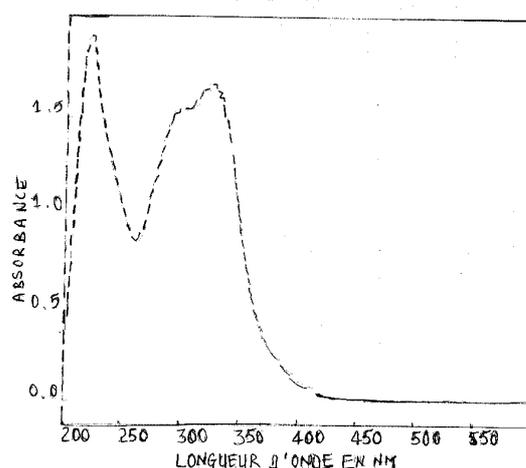
A : Propolis d'El-malha



B : Propolis de Benibelaind



C : Propolis de Kaous



D : Propolis de Jamaa

Figure-20 : Spectres d'absorption UV-visible des propolis testées.

V-1-1-4-b-Profil chimique :

-Chromatographie préparative sur papier :

Le système solvant utilisé est l'acide acétique à 15 %. Les chromatogrammes sont visualisés sous lumière de Wood à 254 et 336 nm. Les différentes bandes de produits présents sont délimitées.

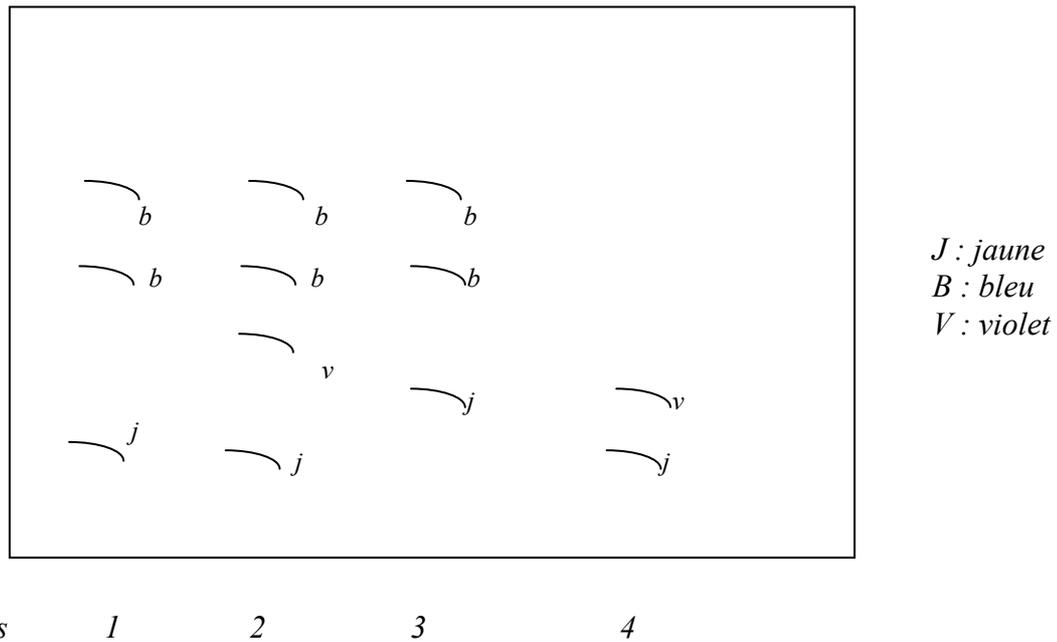


Schéma-7: Chromatographie préparative sur papier.

L'examen en lumière ultraviolette est certainement le procédé le plus utilisé pour la détermination de la structure. En dehors des isoflavones, tous les composés flavoniques apparaissent en UV sous forme de spots colorés dont certains sont fluorescents. Les différentes interprétations sont résumées dans le tableau-20.

Tableau-20: Détermination de la structure des flavonoïdes par l'interprétation de leurs fluorescences.

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5,6,7 tri- OH libres Flavonols 5,7,8 tri- OH libres
Brun-noir	3- OH absent ou 3- OH substitué
Violet	Flavones 5 – OH et 4' –OH Flavones 3- OR* et 5-OH, 4'-OH Flavones 6- ou 8- OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones
Bleu-clair (fluorescent)	Flavones sans 5- OH libre Flavonols sans 5- OH libre avec 3- OH substitué
Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5- OH libre
Jaune-vert brillant	5- OH libre ou 5- OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3- OH libre Aurones, chalcones, flavanones
Jaune pâle	Dihydroflavonols

R* : radical, tel que CH₃

Après avoir déterminé les fluorescences des composés par un examen sous lumière ultraviolette, nous avons pu calculer la valeur du R_f (rapport frontal). La valeur du R_f d'un composé est définie comme suit :

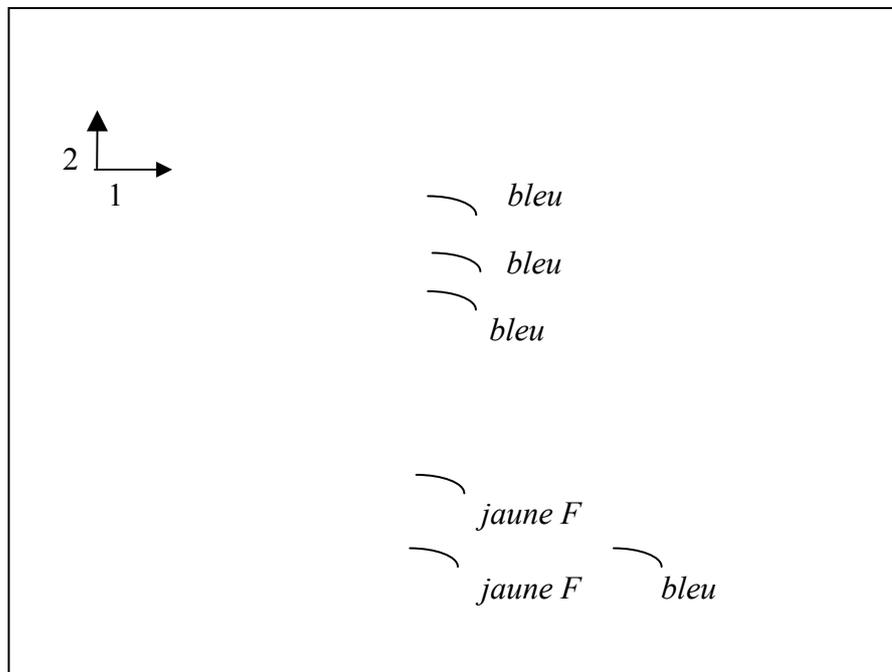
$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

Le comportement chromatographique des flavonoïdes en fonction de leur structure dans un solvant organique ou aqueux nous permet de mentionner les premières indications concernant la substitution du squelette de la molécule flavonique. Les valeurs des R_f ainsi que la fluorescence des spots figurent dans le tableau-21.

Tableau-21: Comportement chromatographique des propolis testées.

Propolis	Fluorescence / Rf			
	1	Jaune 0,19	Bleu 0,49	Bleu 0,63
2	Jaune 0,097	Violet 0,29	Bleu 0,49	Bleu 0,70
3	Jaune 0,26	Bleu 0,52	Bleu 0,73	
4	Jaune 0,052	Violet 0,21		

La chromatographie bidimensionnelle nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques des différents EEP. Les différentes bandes de produits sont délimitées sous lumière ultraviolette. Les cartes flavoniques sont représentées dans les schémas 8, 9, 10 et 11.

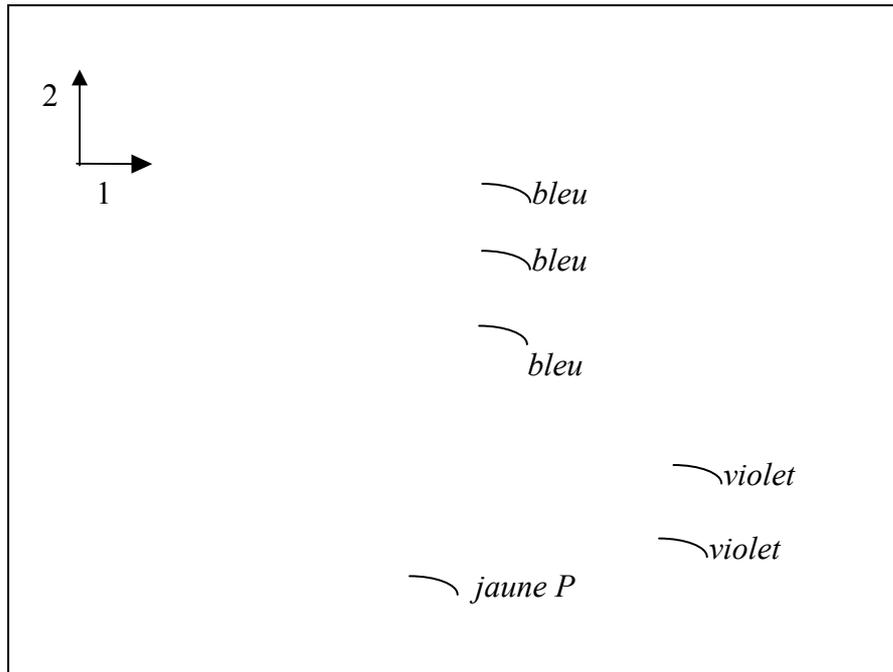


F : fluorescent

1 : système BAW (*n*-butanol / acide acétique / eau)

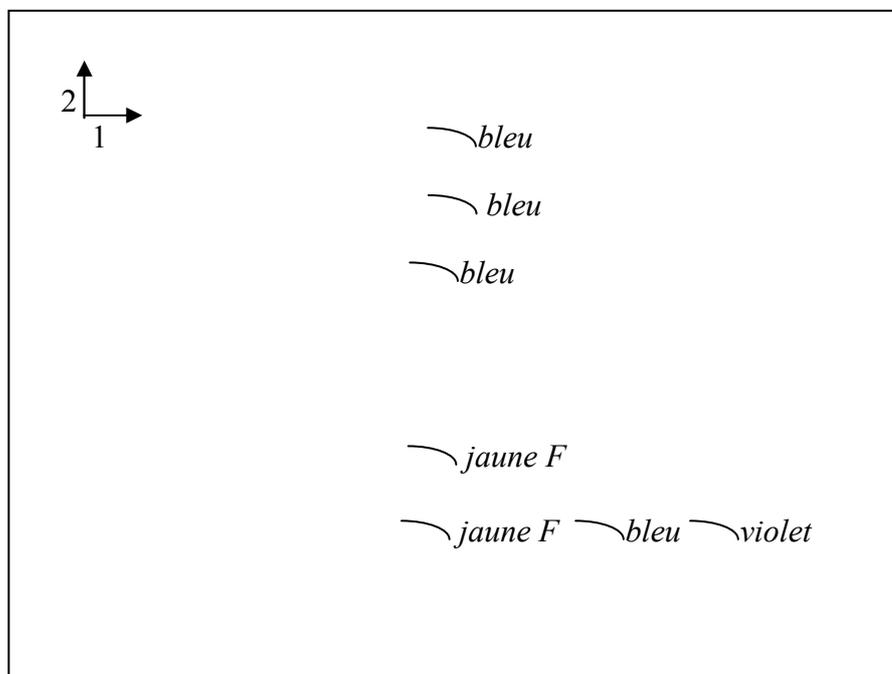
2 : système acide acétique à 15 %

Schéma-8 : Carte flavonique de la propolis 1.



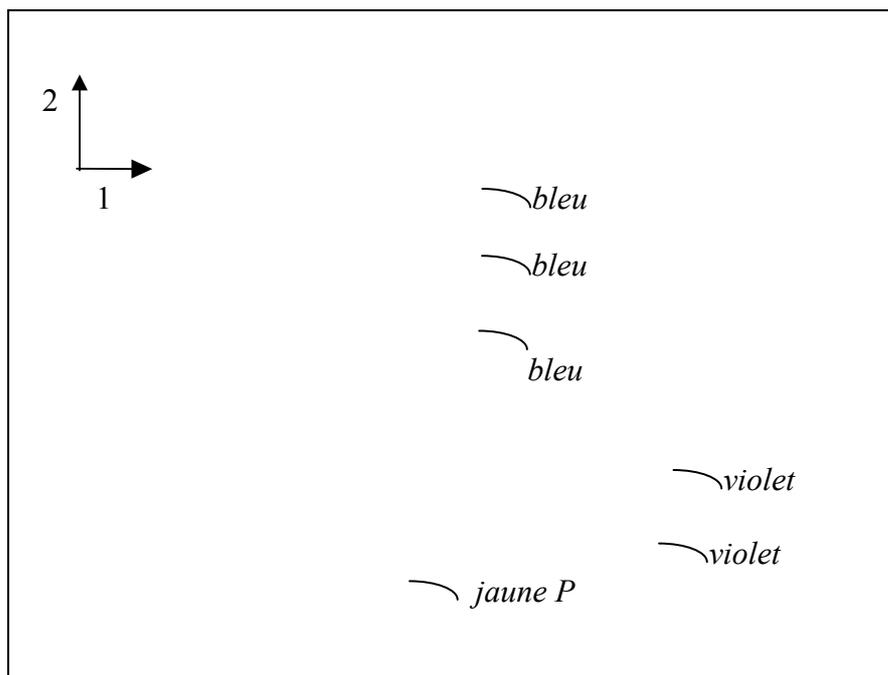
P : pâle

Schéma-9: Carte flavonique de la propolis 2.



F : fluorescent

Schéma-10 : Carte flavonique de la propolis 3.



P : pâle

Schéma-11 : Carte flavonique de la propolis 4.

Nous remarquons que les cartes flavoniques des propolis 1 et 3 présentent beaucoup de taches comparables. Par contre, celle de la propolis 2 et 4 sont presque identiques.

-Chromatographie préparative sur couche-mince :

Pour avoir les empreintes flavoniques et une idée sur la composition chimique des extraits testés, ces derniers subissent une chromatographie analytique sur couche mince. Les différentes bandes de produits sont délimitées sous lumière UV à 336 nm.

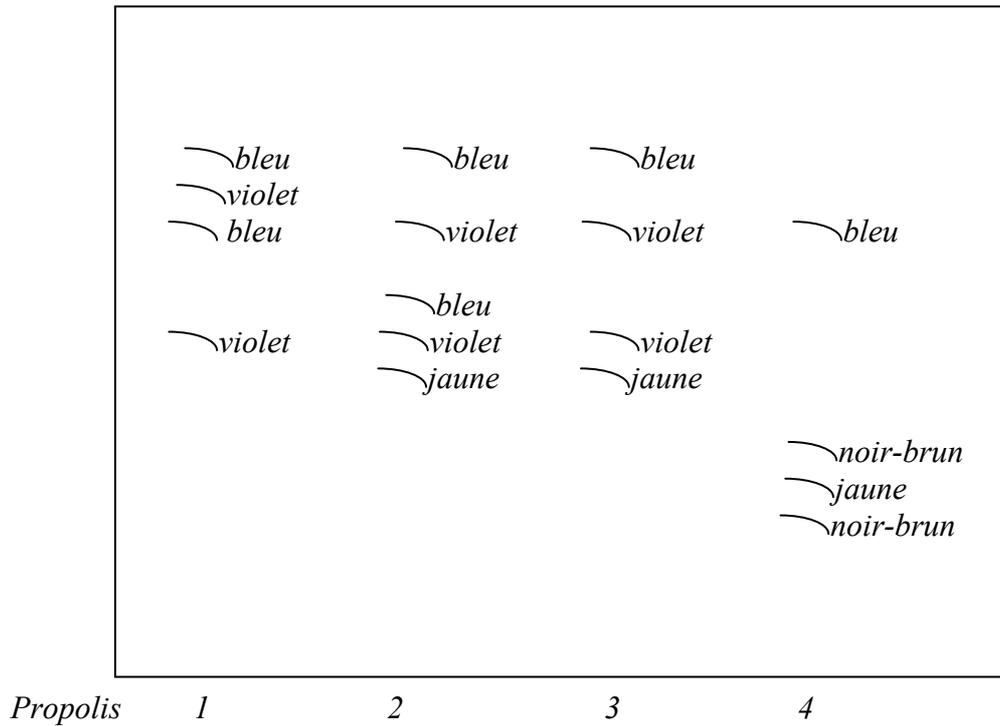


Schéma-12: Chromatographie sur couche mince.

Les couleurs des spots ainsi que leur Rf sont représentés dans le tableau-22.

Tableau -22: Comportement chromatographique des propolis 1-4.

Propolis	Fluorescence / Rf				
1	Violet 0,60	Bleu 0,70	Violet 0,75	Bleu 0,87	
2	Jaune 0,53	Violet 0,60	Bleu 0,65	Violet 0,70	Bleu 0,82
3	Jaune 0,51	Violet 0,60	Violet 0,70	Bleu 0,82	
4	Noir-brun 0,17	Jaune 0,21	Noir-brun 0,26	Bleu 0,71	

L'étude chromatographique (monodimensionnelle) des différentes propolis nous a révélé les résultats rassemblés plus haut. Nous remarquons que toutes les propolis testées présentent dans leurs chromatogrammes les fluorescences jaune, bleue et violette avec des valeurs différentes de rapport frontal (Rf). Les cartes flavoniques des propolis testées nous permettent de distinguer des taches comparables. Cependant, les propolis 1 et 3 ainsi que les propolis 2 et 4 présentent plus de similitudes. Une fluorescence bleue ou violette est en faveur d'une flavone. Par contre, une fluorescence jaune est en faveur d'une flavonol. La présence des flavones et flavonols a été observée au niveau des différentes propolis de la région tropicale par Bonkova et *al* 1982. Nous constatons que la propolis algérienne contient aussi ces composés. Nous pensons cependant que leur concentration dépend de l'origine de la propolis.

Les propolis analysées lors de notre étude sont comparées en fonction de leurs couleurs, spectres d'absorption UV-visible ainsi que leurs profils chromatographiques. Cette comparaison nous permet de faire une première classification des propolis algériennes. Les propolis d'El-malha et Kaous ont le même aspect, la même couleur. En plus, leurs cartes chromatographiques révèlent des tâches comparables. Pour ces raisons, elles sont classées dans le même groupe. Les propolis de Benibelaïd et Jamaa présentent un profil différent. Elles sont donc classées dans un autre groupe.

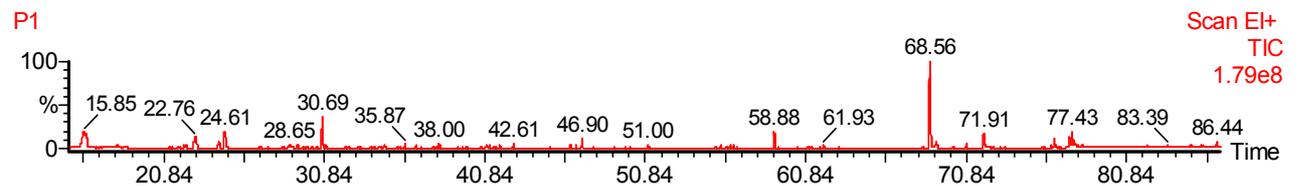
Nous remarquons qu'il existe une relation entre l'effet antibactérien de la propolis et sa composition en produits flavoniques. Nous pensons que la composition qualitative et quantitative de la propolis en favonoïdes est très importante. Cette composition permettra une meilleure classification de la propolis. Elle permettra aussi la standardisation de ce produit pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

Il ressort de notre travail que la propolis est un produit intéressant qui peut avoir des possibilités thérapeutiques. En effet, la propolis est une substance naturelle qui ne nécessite aucune opération chimique sauf celles nécessaires pour son extraction. Elle possède un effet antibactérien sur de nombreuses espèces. Pour ces raisons, elle peut entrer dans la composition des produits d'hygiène (shampooing , savon , dentifrice) , de soins (crèmes , baumes , lotions pour la peau) ou des préparations magistrales sous forme de pommade : l'extrait alcoolique de propolis a des concentrations diverses mélangées à des excipients (lanoline et vaseline) peuvent être utilisées pour les infections de la peau . De plus, on peut utiliser l'effet antibactérien de l'extrait éthanolique de la propolis pour la préparation de solution antiseptique.

V-1-2-Extraction et analyses des huiles essentielles :

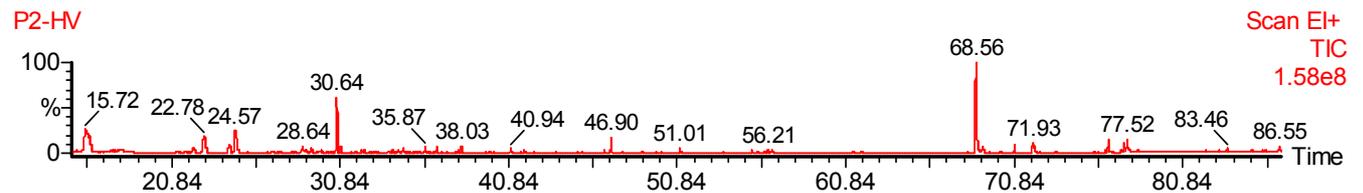
Dans le but de compléter notre étude comparative des propolis de l'Est Algérien, nous sommes intéressés à leur composition en huiles essentielles. L'hydrodistillation des propolis P₁ (El-malha), P₂ (Benibelaid) et P₃ (Kaous) a donné des huiles essentielles de couleur jaune clair. Le rendement est de 0,03% pour P₁ et P₃ et 0,11% pour P₂. Le nombre de composés identifiés pour les huiles des propolis P₁, P₂ et P₃ est de 37, 26 et 30 respectivement. Les chromatogrammes des huiles essentielles des propolis testées sont représentés dans le tableau-23 et la figure-21.

P1H-HUILE ESSENTIELLE



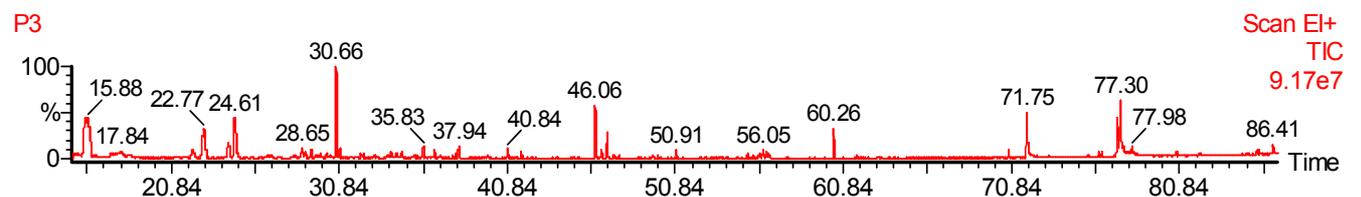
A- Chromatogramme de l'huile essentielle de P₁ (El-malha)

P2HVH-HUILE ESSENTIELLE



B- Chromatogramme de l'huile essentielle de P₂ (Benibelaid)

P3H-HUILE ESSENTIELLE



C- Chromatogramme de l'huile essentielle de P₃ (Kaous)

Figure- 21: GC-MS des huiles essentielles des propolis P₁, P₂ et P₃.

Tableau-23: Composition des huiles essentielles des propolis P₁, P₂ et P₃.

Compounds	R _t	P ₁ (%)	P ₂ (%)	P ₃ (%)
2-nonanoe	17,42	0,55	-	-
cyclopentanol, 3-methyl	17,92	1,25	-	-
2-hexenal	24,61	4,85	1,14	11,15
1-octanal	26,82	-	0,64	-
Cyclohexane, diethyl	27,32	1,01	0,50	-
1,2,3,5 tetramethyl cyclohexane	28,02	0,04	1,86	Traces
Isooctane	30,33	0,23	3,89	-
Undecane	30,92	0,46	2,03	0,34
Trans-alpha dihydroterpineol	31,81	-	0,09	-
DL- limonene	32,72	0,03	0,09	0,09
Decane	33,73	-	0,39	0,95
1-phenyl-2-butanone	34,10	0,02	-	-
Dodecanal	34,57	0,01	0,96	0,89
Prehnitol	35,32	-	0,32	0,02
<i>p</i> -cymene	35,86	-	1,21	1,27
Nonanol	36,85	-	-	0,34
1H indene 2,3 dihydromethyl	36,96	0,01	-	0,08
1-methyl indene	36,98	-	0,06	-
1(-)-indene,1 methylene	36,98	-	0,20	-
D-isomenthol	37,11	0,03	-	-
+(R)- <i>p</i> -mentha-1,8 dien-4-ol	37,63	0,10	-	-
Trans pinocarveol	39,09	0,12	-	0,05
<i>p</i> -mentha-1,5 dien-8-ol	39,57	0,03	-	-
<i>p</i> -menth-1-ene-3,8 diol	40,55	0,22	-	0,12
Menthol	40,93	0,36	1,03	0,12
4-terpineol	41,03	0,33	-	0,05
<i>p</i> -cymene-8-ol	41,30	-	-	0,16
Naphthalene	41,43	-	-	0,16
1-H indene	41,53	0,07	-	-
<i>p</i> -menth-1-ene-8-ol	41,84	0,06	-	-
Dodecanal	42,15	0,02	-	-
1-dodecane	44,89	0,05	0,18	0,01
Thymol	46,06	-	-	4,47
Carvacrol	46,48	-	-	0,30
Tridecane	46,56	0,63	0,82	0,07
2,4 decadienal (E,E)	46,58	0,14	0,17	Traces
Cis-salvene	47,47	-	-	0,25
Camphene	48,87	Traces	-	-
Nerolidol	52,41	0,02	-	0,09
Germacrene D	54,58	Traces	-	-
(-)-spathulenol	58,88	1,6	-	-
Alpha-cedrol	60,26	0,15	-	2,57
Alpha-gurjunene	60,98	0,07	-	-
Hexadecane	61,21	0,28	1,14	-
Alpha-cudesmol	61,92	0,40	-	-
Palmitic acid	70,84	0,38	1,05	0,53
Myristic acid	71,92	2,03	1,65	5,66
9,12 octadecanoic acid(Z,Z)methyl ester	76,01	-	0,44	0,40
6-octadecanoic acid, methyl ester	76,21	0,07	-	0,55
Octadecane	76,34	1,01	0,07	-
1-dotricontanol	76,41	-	2,33	-
Methyl 13-methyltetradecanoate	77,19	-	0,36	-
Linoleic acid	77,51	1,86	2,18	5,16
Cyclotetradecane	80,65	-	6	0,30
Octacosane	83,65	0,32	-	-
Others	-	56,89	48,7	35,87

R_t: Retention time.; P₁: Propolis of El-malha.; P₂: Propolis of Benibelaid.; P₃: Propolis of Kaous.

Douze composés sont communs dans la composition des huiles essentielles des trois propolis étudiées. Ces composés sont : 2-hexenal, 1, 2, 3, 5 tetra méthyl cyclohexane, 2,4-decadienal (E,E), DL-limonene, dodecanal, menthol, 1-dodecane, tridecane, undecane, palmitic acid, myristic acid et linoleic acid. Cependant le pourcentage de ces composés varie en fonction de la propolis étudiée. Par exemple l'huile essentielle de P₂ est composée de 2,03% d'undecane. Le pourcentage de ce composé est 0,46 % et 0,34 % dans les huiles des propolis P₁ et P₃ respectivement. Nous remarquons que :

- Les constituants majeurs de l'huile essentielle de P₁ sont : 2-hexenal (4,85%), myristic acid (2,03%), linoleic acid (1,86%) et (-)-spathulenol (1,6%).
- Les constituants majeurs de l'huile essentielle de P₂ sont : isooctane (3,89%), linoleic acid (2,18%), undecane (2,03%), myristic acid (1,65%), hexadecane (1.14%), p-cymene (1,21%), palmitic acid (1,05%) et 4-terpineol (1,03%).
- Les constituants majeurs de l'huile essentielle de P₃ sont : 2-hexenal (11,15%), myristic acid (5,66%), linoleic acid (5,16%), carvacrol (4,47%), alpha-cedrol (2,57%) et p-cymene (1,27%).

Dans toutes les huiles essentielles analysées les acides représentent 4,34%, 5,32% et 12,3% pour P₁, P₂ et P₃. Les monoterpènes représentent 1,55%, 2,74% et 6,90% (tableau-24).

Tableau-24: Classes des composés présents dans les huiles essentielles des propolis P₁, P₂ et P₃.

Grouped components	P ₁ (%)	P ₂ (%)	P ₃ (%)
Monoterpene hydrocarbons	0,03	1,30	1,61
Oxygen-containing monoterpenes	1,25	1,44	5,26
Sesquiterpene hydrocarbons	0,07	-	-
Oxygen-containing sesquiterpenes	2,17	-	2,66
Aliphatic hydrocarbures	5,04	11,38	1,68
Aromatic hydrocarbures	0,08	0,26	0,24
Acids	4,34	5,32	12,3
Alcohols, phenols,aldehydes and cetones	6,84	5,60	12,38
Others	56,89	48,70	35,87

La propolis de Kaous est riche en monoterpènes oxygénés (carvacrol 4,47%). Par contre, la propolis de Benibelaid est riche en hydrocarbures monoterpéniques (menthol 1,03%). Les sesquiterpènes représentent 2,24% de l'huile de P₁ (0,02% nerolidol, 1,6% (-)-spathulenol, 0,41% alpha eudesmol, 0,15% alpha-cedrol and 0,07% alpha-gurjunene). Cette classe est absente dans la composition de l'huile de P₂. Elle est présente à l'état de trace dans la composition de l'huile de P₃. Le rendement et la composition des huiles essentielles de

la propolis varient en fonction de la zone de la récolte. Ces variations sont en rapport avec l'origine botanique de la propolis.

Il est intéressant de noter que l'huile essentielle des propolis algériennes testées est très riche en acides, hydrocarbures, alcools, aldéhydes et cétones. Cette composition est très différente des autres études rapportées sur les propolis du Brésil (Bankova *et al* 1994 et 1999), Croatie (Borcic *et al* 1998) et Grèce (Melliou *et al* 2007) qui sont plus riches en monoterpènes et sesquiterpènes. Cette différence est probablement due aux différences géographiques et climatiques qui influencent l'origine botanique de ces propolis. Des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer l'origine botanique de la propolis algérienne. Ces études permettront une meilleure classification de notre propolis.

V-2-Etude de la propolis P₂ :

V-2-1- Etude de l'activité cicatrisante:

Les résultats de notre étude comprenant les variations des poids, les pourcentages de la réduction de la surface des plaies, ainsi que, les observations macroscopiques. Après 18 jours de traitement les résultats sont présentés ci-dessous.

IV-2-1-a- variation du poids :

Les valeurs des poids des rats des deux lots sont résumées dans le tableau-25.

Tableau -25: Variation du poids en fonction du temps.

N° Lot	Poids (g)	1 ^{er} jour	3 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour	12 ^{ème} jour	15 ^{ème} jour	18 ^{ème} jour
	Rats							
Lot Témoin	Rat1	97.2	122.7	134	142.9	146.3	162.6	174
	Rat2	189	184.5	192.9	212.5	214	216.8	224.9
	Rat3	133.4	143.5	153.4	152.6	173.3	180.6	200.4
	Rat4	181.9	163.5	164	180.1	188.7	191.4	207.5
Moyenne ± écart type		150.38±43.21	153.55±26.52	161.08±24.59	172.03±31.25	180.58±28.35	187.85±22.66	201.70±21.14
Lot Traité	Rat1	180.6	178.5	187.7	197.6	204.1	215.2	197.6
	Rat2	184.5	186.2	188.2	189.1	190.1	195	210.1
	Rat3	114	126	134.2	145	153.5	166.5	160
	Rat4	146.6	185.7	202	220	236	222.8	239.2
Moyenne ± écart type		156.43±33.01	169.10±28.95	178.03±29.96	187.93±31.44	195.93±34.19	199.88±25.15	201.73±32.83

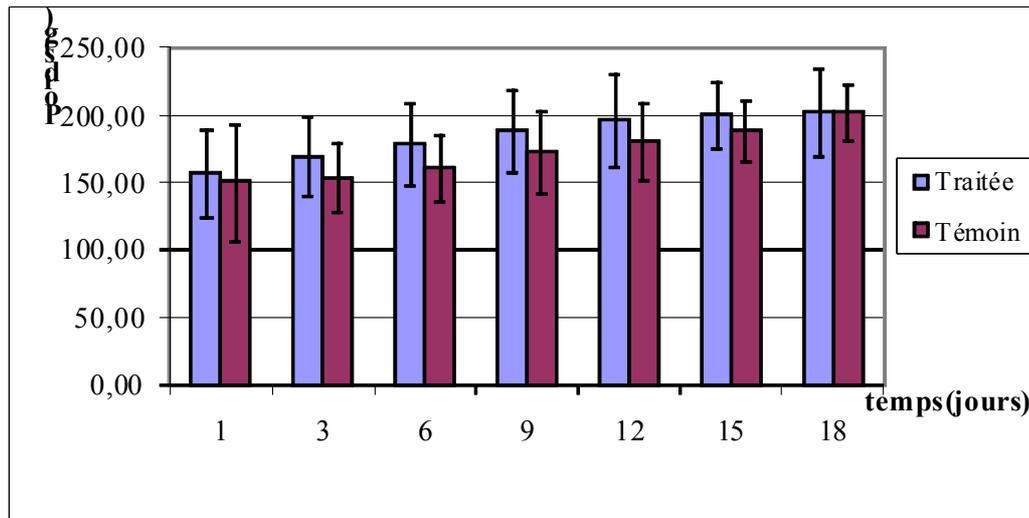


Figure-22 : Représentation graphique de la variation du poids en fonction du temps.

Les valeurs des poids augmentent légèrement et régulièrement au cours du traitement : de $150,37 \pm 43,21$ g au début du traitement à $201,7 \pm 21,14$ g au 18^{ème} jour chez les rats témoins. L'évolution du poids des rats traités suit le même profil de $156,42 \pm 33,01$ g au début du traitement à $201,8 \pm 32,85$ g au 18^{ème} jour. L'étude statistique montre que l'évolution des poids des deux lots ne présente aucune différence significative ($P > 0,05$) pendant toute la durée de l'expérimentation.

Nous n'avons observé aucun changement dans le comportement des animaux qui ne semblent pas affectés par la présence des plaies sur leur partie antéro-dorsale. Au cours de l'application du traitement les animaux n'ont montré aucun signe d'agressivité.

V-2-1-b-Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies des rats témoins (1) et traités (3) :

Les variations du pourcentage de la réduction de la surface des plaies contrôles négatifs et des plaies traitées sont résumées dans le tableau-26.

Tableau-26: Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies 1 et 3.

N° Lot	Surfaces (%)	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	8 ^{ème} jour	12 ^{ème} jour	16 ^{ème} jour	18 ^{ème} jour
	Plaies							
Lot Témoin	Plaie1	0	0	10	38.75	95	100	100
	Plaie1	0	0	25.33	76.66	96	99.66	100
	Plaie1	0	0	42.2	80.73	99.77	100	100
	Plaie1	0	0	45	71.42	99.82	100	100
Moyenne ± écart type		0.00±0.00	0.00±0.00	30.63±16.27	66.89±19.14	97.65±2.51	99.92±0.17	100.00±0.00
Lot Traité	Plaie3	0	0	36	80	99	100	100
	Plaie3	0	0	35	85.45	100	100	100
	Plaie3	0	0	30	88.75	100	100	100
	Plaie3	0	0	48	70	99.37	100	100
Moyenne ± écart type		0.00±0.00	0.00±0.00	37.25±7.63	81.05±8.20	99.59±0.49	100.00±0.00	100.00±0.00

plaie 1 : contrôle négatif (aucun traitement).

Plaie 3 : plaie traitée par l'extrait de propolis à 30%.

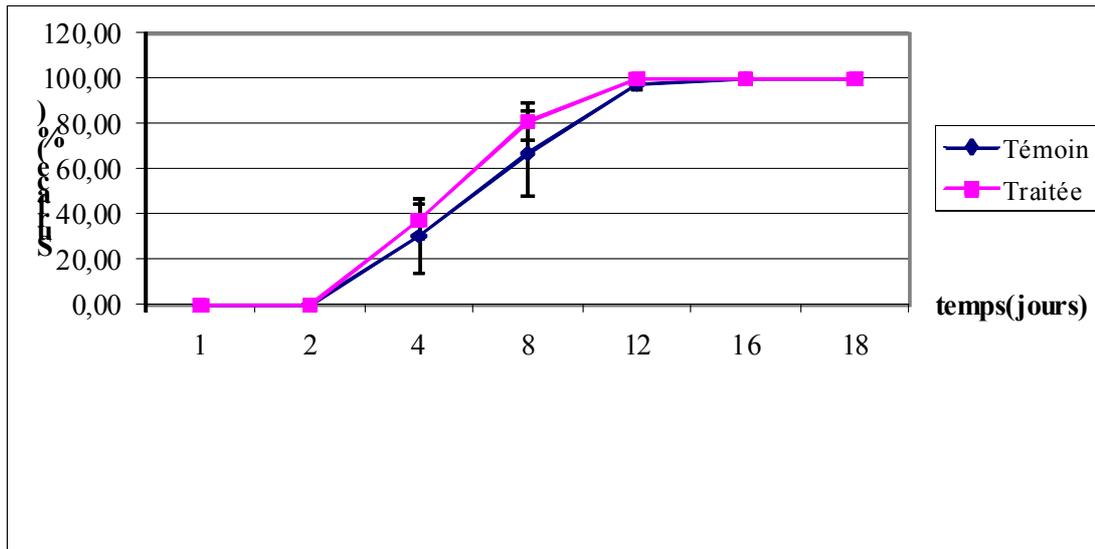


Figure-23 : Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies 1 et 3.

Le traitement des animaux par l'extrait de propolis à 30% pendant 8 jours n'a entraîné qu'une légère augmentation du pourcentage de la réduction de la surface par rapport à la plaie contrôle négatif. L'étude statistique montre que les variations du pourcentage de la réduction de la surface des deux plaies ne présentent aucune différence significative ($P > 0.05$). Cependant nos observations macroscopiques ont montré quelques changements au niveau des paramètres surveillés. Nos observations indiquent que le temps de disparition de la rougeur, de l'œdème et du bourgeon pour les rats traités par l'extrait de propolis survient au bout du 3^{ème} jour, par contre ce phénomène ne survient qu'au bout du 4^{ème} jour pour les rats témoins. La comparaison des observations macroscopiques montre que pour les rats traités par l'extrait de propolis à 30% la croûte apparaît au 4^{ème} jour et se maintient jusqu'au 8^{ème} jour, puis laisse place au nouveau tissu cicatriciel rose et fragile. En revanche pour les rats témoins nous avons constaté que la croûte apparaît au 6^{ème} jour et se maintient jusqu'au 13^{ème} jour.

V-2-1-c-Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies des rats témoins (1) et traités (4) :

Nos résultats sont présentés dans le tableau-27

Tableau - 27: Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies 1 et 4.

N° Lot	Surfaces (%)	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	8 ^{ème} jour	12 ^{ème} jour	16 ^{ème} jour	18 ^{ème} jour
	Plaies							
Lot Témoin	Plaie1	0	0	10	38.75	95	100	100
	Plaie1	0	0	25.33	76.66	96	99.66	100
	Plaie1	0	0	42.2	80.73	99.77	100	100
	Plaie1	0	0	45	71.42	99.82	100	100
Moyenne ± écart type		0.00±0.00	0.00±0.00	30.63±16.27	66.89±19.14	97.65±2.51	99.92±0.17	100.00±0.00
Lot Traité	Plaie4	0	0	58.67	89.79	99.49	100	100
	Plaie4	0	0	35	77.27	99.09	100	100
	Plaie4	0	0	20	86.66	100	100	100
	Plaie4	0	0	28.88	72.22	98.88	100	100
Moyenne ± écart type		0.00±0.00	0.00±0.00	35.64±16.54	81.49±8.15	99.37±0.49	100.00±0.00	100.00±0.00

Plaie 1 : contrôle négatif (aucun traitement).

Plaie 4 : plaie traitée par le remède à base de propolis.

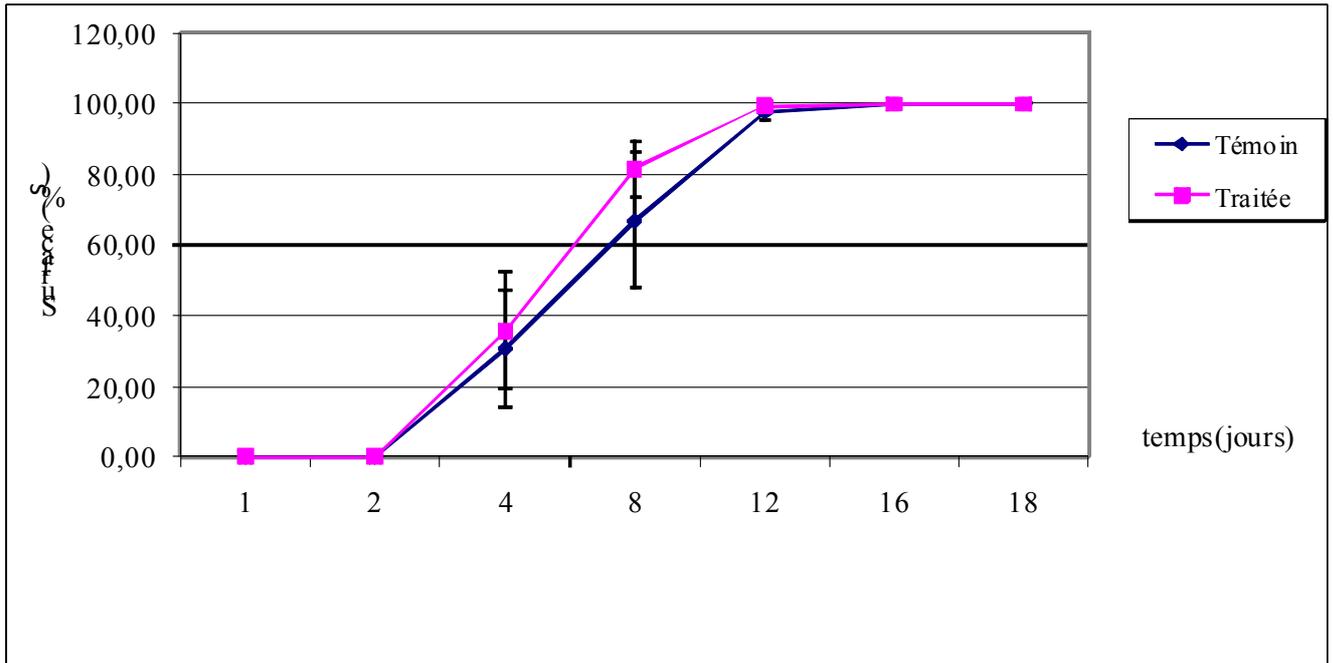


Figure-24 : Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies 1 et 4.

Nos résultats montrent que le pourcentage de la réduction des deux plaies augmente à partir du 2^{ème} jour du traitement. Pour atteindre une réduction totale (100%) au bout du 12^{ème} jour. La comparaison entre l'évolution du pourcentage de la réduction de la surface des deux plaies (1, 4) ne montre aucune variation significative ($P > 0.05$) et ceux pour toute la durée du traitement. Cependant nos observations macroscopiques, ont montré quelques changements au niveau des phénomènes surveillés. La rougeur, l'œdème et le bourgeon sont observés immédiatement après la provocation des plaies et se poursuivent jusqu'au 4^{ème} jour pour la plaie contrôle négatif. Par contre, ces phénomènes disparaissent après 3 jours d'application du remède à base de propolis. On peut noter que la croûte apparaît chez les animaux témoins (contrôle négatif) au bout du 6^{ème} jour et se maintient jusqu'au 13^{ème} jour. Contrairement aux rats traités par le remède à base de propolis pour lesquels la croûte apparaît au 5^{ème} jour et disparaît au 9^{ème} jour.

V-2-1-d- Variations du pourcentage de la réduction de la surface des plaies des rats témoins (2) et traités (4):

Les variations du pourcentage de la réduction de la surface des plaies contrôle positif et des plaies traitées par le remède à base de propolis sont rassemblées dans le tableau-28.

N° Lot	Surfaces (%)	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	8 ^{ème} jour	12 ^{ème} jour	16 ^{ème} jour	18 ^{ème} jour
	Plaies							
Lot Témoin	Plaie2	0	0	22.22	80.95	98.41	100	100
	Plaie2	0	0	27.27	67.27	96.36	99.09	100
	Plaie2	0	0	48.62	67.88	100	100	100
	Plaie2	0	0	53.33	75	99.16	100	100
Moyenne ± écart type		0.00±0.00	0.00±0.00	37.86±15.40	72.78±6.48	98.48±1.56	99.98±0.05	100.00±0.00
Lot Traité	Plaie4	0	0	48.97	89.79	99.48	100	100
	Plaie4	0	0	18.18	77.27	99.09	100	100
	Plaie4	0	0	20	86.66	100	100	100
	Plaie4	0	0	28.88	72.22	98.88	100	100
Moyenne ± écart type		0.00±0.00	0.00±0.00	35.64±16.54	81.49±8.15	99.37±0.49	100.00±0.00	100.00±0.00

Plaie 2 : contrôle positif (reçoivent la vaseline).

Plaie 4 : plaie traitée par le remède à base de propolis.

Tableau -28: Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies 2 et 4.

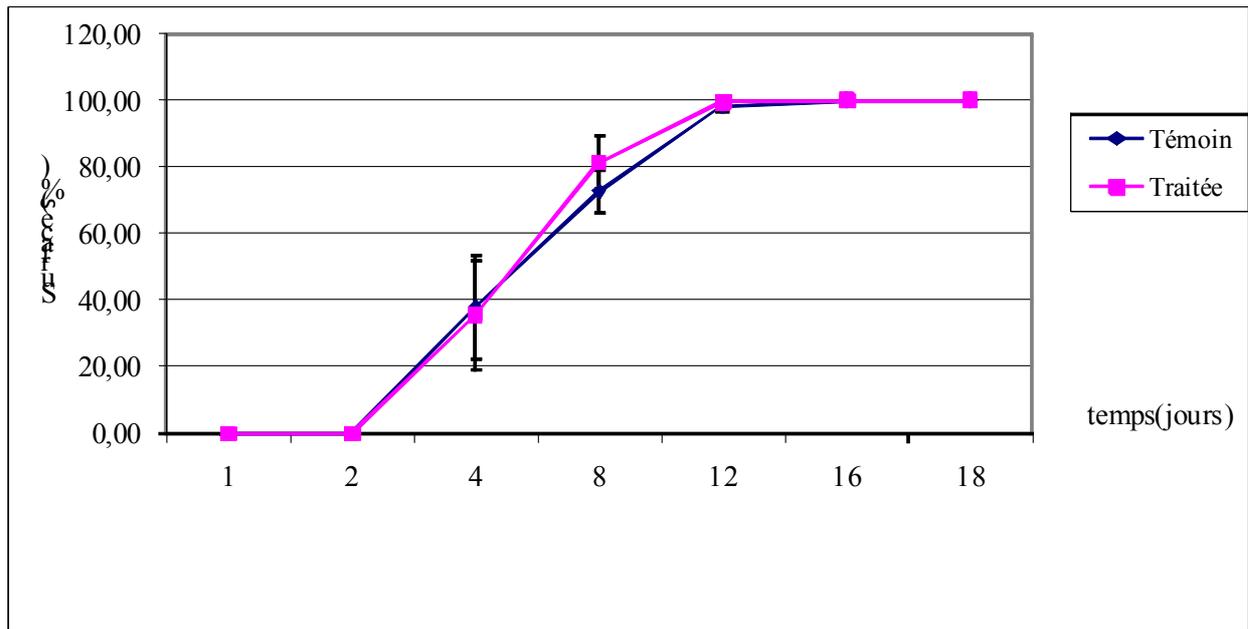


Figure-25: Variation du pourcentage de la réduction de la surface des plaies 2 et 4.

Les valeurs du pourcentage de la réduction de la surface des plaies 2 et 4 augmentent légèrement au cours du traitement. L'étude statistique ne montre aucune différence significative ($P>0.05$) entre les deux plaies pour toute la durée de notre étude. Nos observations macroscopiques indiquent que la disparition de la rougeur, de l'œdème et du bourgeon pour les rats traités par le remède à base de propolis survient au bout du 3^{ème} jour. Par contre, ces phénomènes ne disparaissent qu'après le 4^{ème} jour pour les rats témoins (contrôle positif). La croûte observée au 5^{ème} jour pour le lot traité par le remède à base de propolis à 30% et disparaît au bout du 9^{ème} jour. Cependant pour le lot témoin la croûte n'apparaît qu'au 6^{ème} jour et se maintient jusqu'au 11^{ème} jour. L'éthanol à 80% est utilisé pour l'extraction parce qu'il s'évapore à basse température, condition nécessaire pour éliminer le risque de destruction des composants actifs de la propolis si ces derniers sont sensibles à la chaleur.

Notre travail montre que la propolis possède une faible activité cicatrisante. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Kleinrok *et al* 1978 et Jarrahi *et al* 2004. Par contre nos résultats sont en désaccords avec les travaux de Scheller *et al* 1977 et Gabrys *et al* 1986 qui ont montré une bonne activité cicatrisante de la propolis. Nous pensons que cette variation de l'effet de la propolis sur le processus cicatriciel est probablement due à son

origine botanique qui entraînerait une variation de sa composition chimique. Ce phénomène est rapporté par [Hegazi 1997](#).

La propolis testée est très riche en composés flavoniques essentiellement flavones et flavonols. Nos résultats laissent supposés que les flavonoïdes de cette propolis sont dépourvus de toute activité cicatrisante. Cette activité peut être due à un composé de nature non flavonique ou à un composé flavonique présent en quantité insuffisante. Plus d'études sur la composition chimique de cette propolis ainsi que des tests de l'effet cicatrisant de propolis provenant d'autres régions algériennes sont nécessaires.

Nos observations concernant la disparition de la rougeur, de l'oedème et du bourgeon montrent clairement que ces phénomènes apparaissent plus rapidement chez les animaux traités à la propolis (extrait éthanolique de la propolis et remède à base de propolis). Les trois phénomènes surveillés caractérisent la réaction inflammatoire qui semble disparaître plus rapidement par l'application de la propolis. En effet, la rougeur correspond à une vasodilatation entraînant l'augmentation du flux sanguin par contre l'oedème correspond à une augmentation de la perméabilité vasculaire ([Claude et Grumbach 2003](#)). Nos résultats laissent supposer que la propolis pourrait avoir une activité anti-inflammatoire. Ce phénomène a été signalé par [Park et al 1996](#). Plus d'études concernant cette activité sont nécessaires.

La disparition plus rapide de la croûte laisse supposer que la propolis agirait au niveau de l'étape de la formation du tissu de granulation. Plus d'études sont nécessaires pour mettre en évidence l'action de la propolis sur le processus inflammatoire ainsi que son effet sur l'étape de la formation du tissu de granulation.

Nous avons remarqué que l'application répétée de l'extrait éthanolique de propolis et du remède à base de propolis durant 18 jours sur la peau des animaux n'entraîne aucune hypersensibilité. Ces résultats sont en désaccord avec les travaux de [Hashimoto et al 1988](#) et [Hausen et al 1987](#) qui ont signalé la présence d'une réaction d'hypersensibilité au contact de la propolis.

V-2-2-Etude phytochimique:

V-2-2-1-Identification des produits de l'extrait acétate d'éthyle :

V-2-2-1-1-Elucidation structurale du composé F₁₃₋₁ :

La fluorescence violette en UV et les valeurs des Rf de ce composé sur cellulose dans les systèmes BAW (4 / 1 / 5 ; Rf = 0,82) et AcOH (15% ; Rf = 0) sont en faveur d'une structure aglycone de type flavone. Le spectre UV-Visible dans le méthanol de ce composé (tableau-30, figure-26) présente deux bandes d'absorption maximales à 268 et 333 nm ce qui confirme que ce composé est une flavone.

Le spectre enregistré après addition de la soude (NaOH) présente un déplacement bathochrome de 54 nm de la bande I par rapport au spectre méthanol, sans diminution de son intensité ce qui est en faveur d'un hydroxyle libre en position 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm indique que le carbone 7 est substitué par un alcoxy (OR en 7). Cette substitution est confirmée par l'absence d'un déplacement de la bande II du spectre enregistré après addition de NaOAc.

L'absence de déplacement bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre méthanol indique l'absence d'un ortho di-OH sur le noyau B. L'absence d'un effet hypsochrome de la bande I du spectre enregistré dans l'AlCl₃ + HCl par rapport au spectre AlCl₃ confirme cette hypothèse. L'effet bathochrome de 46 nm de la bande I dans le spectre AlCl₃ + HCl par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un OH libre en position 5.

Tableau-29: Données chromatographiques du composé F₁₃₋₁.

Système	BAW (4 / 1 / 5)	AcOH (15%)
Rf	0,82	0
Fluorescence	Violette	

Tableau-30: Maximum d'absorption du produit F₁₃₋₁ dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	333	268	-
NaOH	387	268	-
NaOAc	388	268	-
NaOAc + H ₃ BO ₃	333	268	-
AlCl ₃	379	299	334, 275
AlCl ₃ + HCl	379	299	342, 275

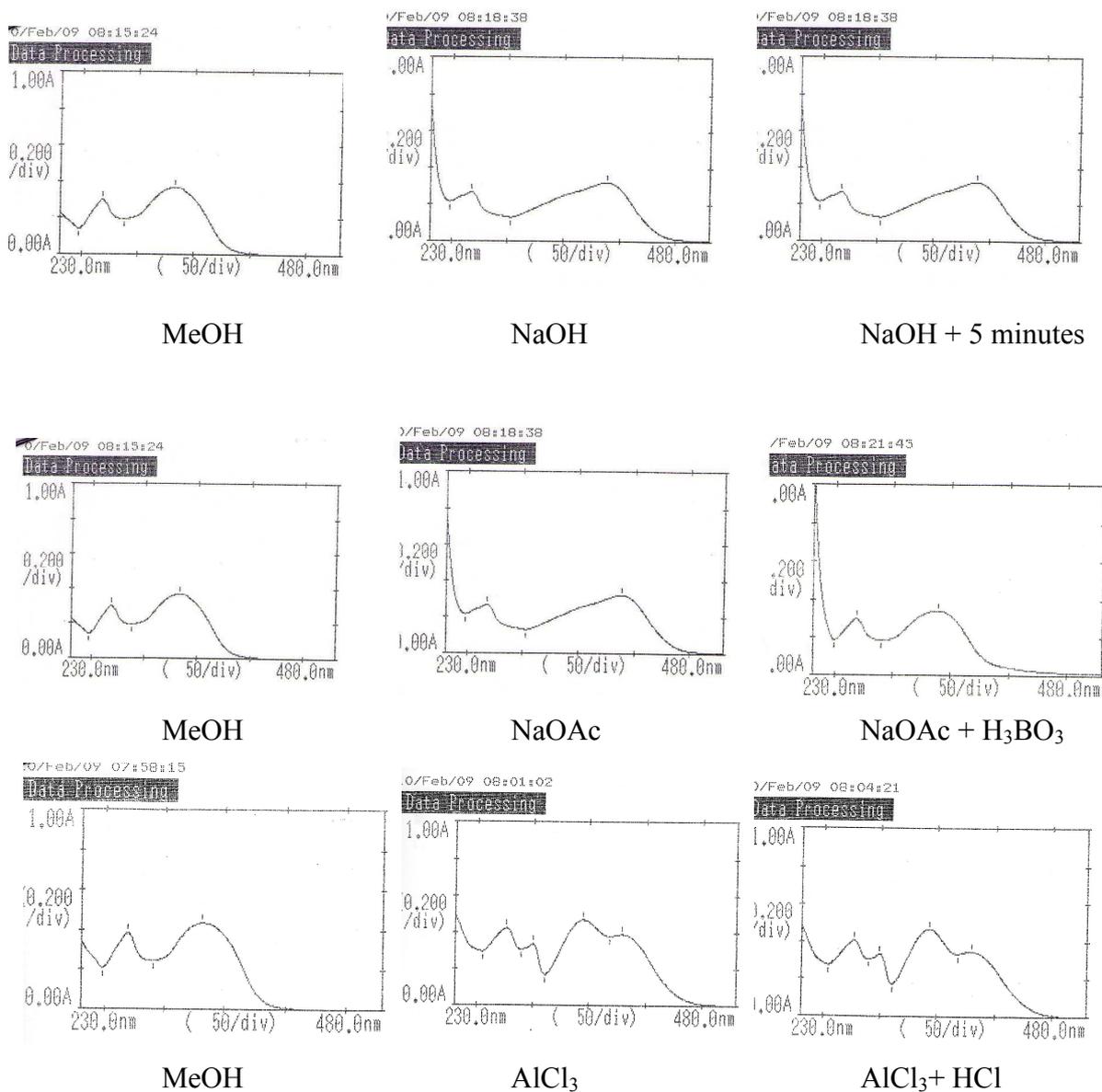


Figure-26 : Spectres d'absorption UV-visible du produit F₁₃₋₁.

Le spectre de masse en impact électronique EI⁺-MS du composé F₁₃₋₁ montre un pic [M]⁺ à $m/z = 314$ ce qui correspond à la formule C₁₇H₁₄O₆. Ce composé est une dihydroxy diméthoxyflavone dont les hydroxyles libres sont en position 5 et 4' alors que l'un des méthoxyles est en position 7 (position confirmée par la série spectrale UV-Visible). La position du second méthoxyle en position 3' n'a pu être confirmée que par comparaison des spectres enregistrés dans le méthanol, méthanol / AlCl₃ et méthanol / AlCl₃ + HCl par rapport aux travaux de Voirin 1983 et Mabry *et al* 1970. Donc la structure de ce composé est : 5,4'-dihydroxy-7, 3'-diméthoxyflavone.

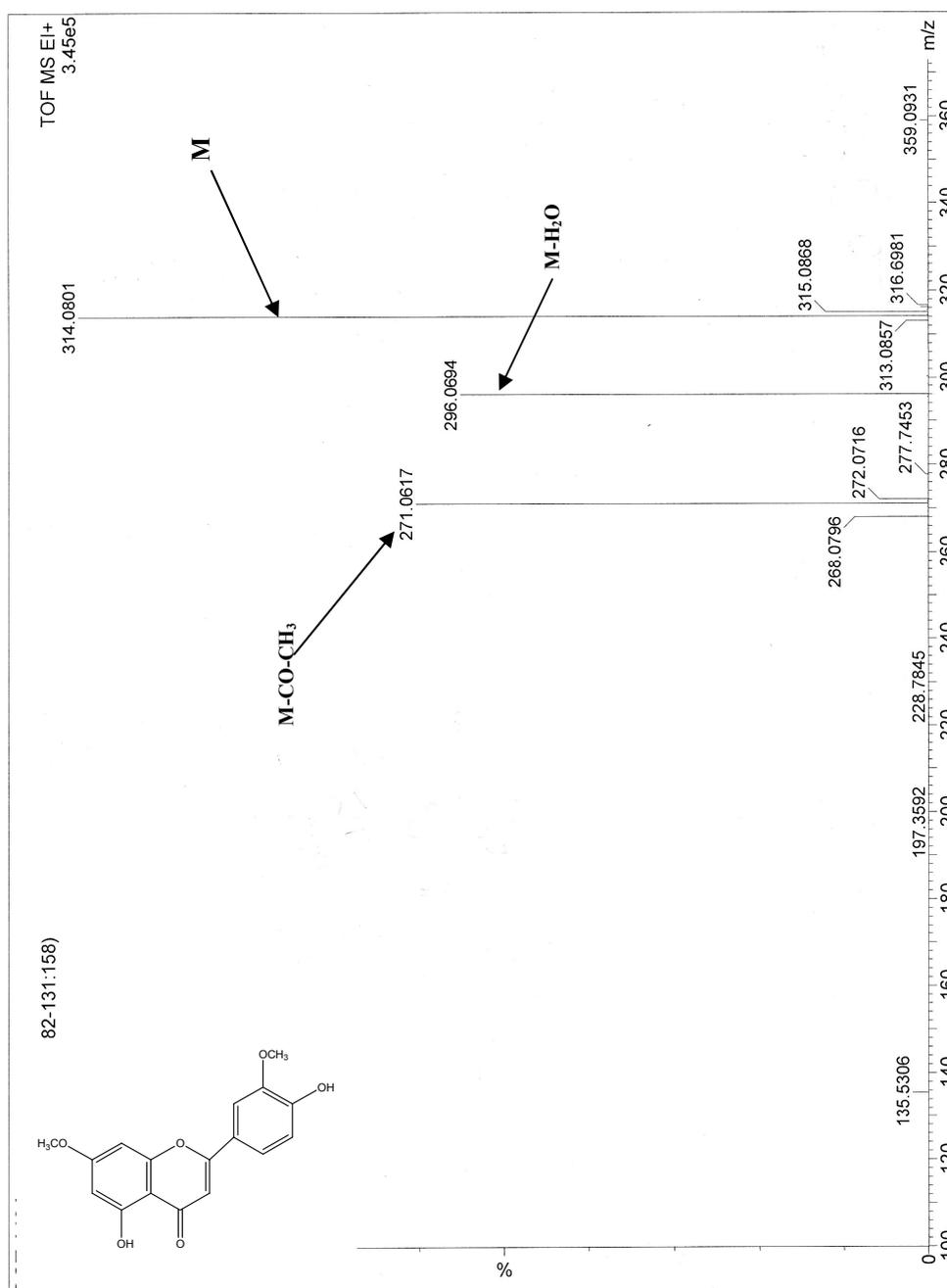
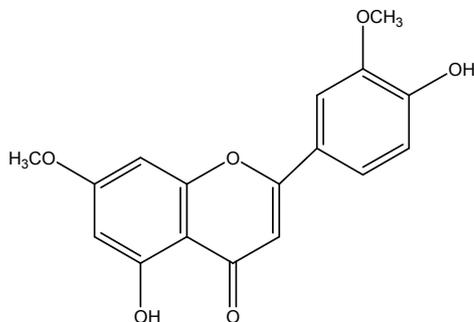


Figure-27 : Spectre de masse du produit F₁₃₋₁

Les spectres UV-visible en présence des différents réactifs ainsi que le spectre de masse en impact électronique du produit F₁₃₋₁ nous oriente vers la structure : 5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone.



5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone.

V-2-2-1-2 Elucidation structurale du composé F₁₃₋₂:

La fluorescence violette en UV et les valeurs de Rf de ce composé sur cellulose dans les systèmes BAW (4 / 1 / 5 ; Rf = 0,88) et AcOH (15% ; Rf = 0) sont en faveur d'une structure aglycone. Le spectre UV-visible (tableau-32, figure-28) présente deux bandes d'absorption à 268 et 333 nm ce qui nous oriente vers une structure de type flavone.

L'effet bathochrome de 59 nm de la bande I dans le spectre méthanol en présence de NaOH par rapport au spectre méthanolique, sans diminution en intensité est en faveur de la présence d'un hydroxyle libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 326 nm est en faveur d'un hydroxyle libre en position 7, ce qui a été confirmé par l'effet bathochrome de 7 nm de la bande II du spectre enregistré après addition de NaOAc par rapport au spectre méthanolique.

L'effet bathochrome de 48 nm de la bande I du spectre méthanol + AlCl₃ + HCl par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5. L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I du spectre enregistré dans l'AlCl₃ + HCl par rapport à celui de l'AlCl₃ indique l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le noyau B. Ceci est confirmé par l'absence de déplacement de la bande I du spectre enregistré en présence de NaOAc + H₃BO₃ par rapport à celui du méthanol.

Tableau-31: Données chromatographiques du composé F₁₃₋₂.

Système	BAW (4 / 1 / 5)	AcOH (15%)
Rf	0,88	0
Fluorescence	Violette	

Tableau-32: Maximum d'absorption du produit F₁₃₋₂ dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	333	268	-
NaOH	392	275	326
NaOAc	387	275	308
NaOAc + H ₃ BO ₃	339	270	-
AlCl ₃	382	275	302, 374
AlCl ₃ + HCl	381	277	301, 341

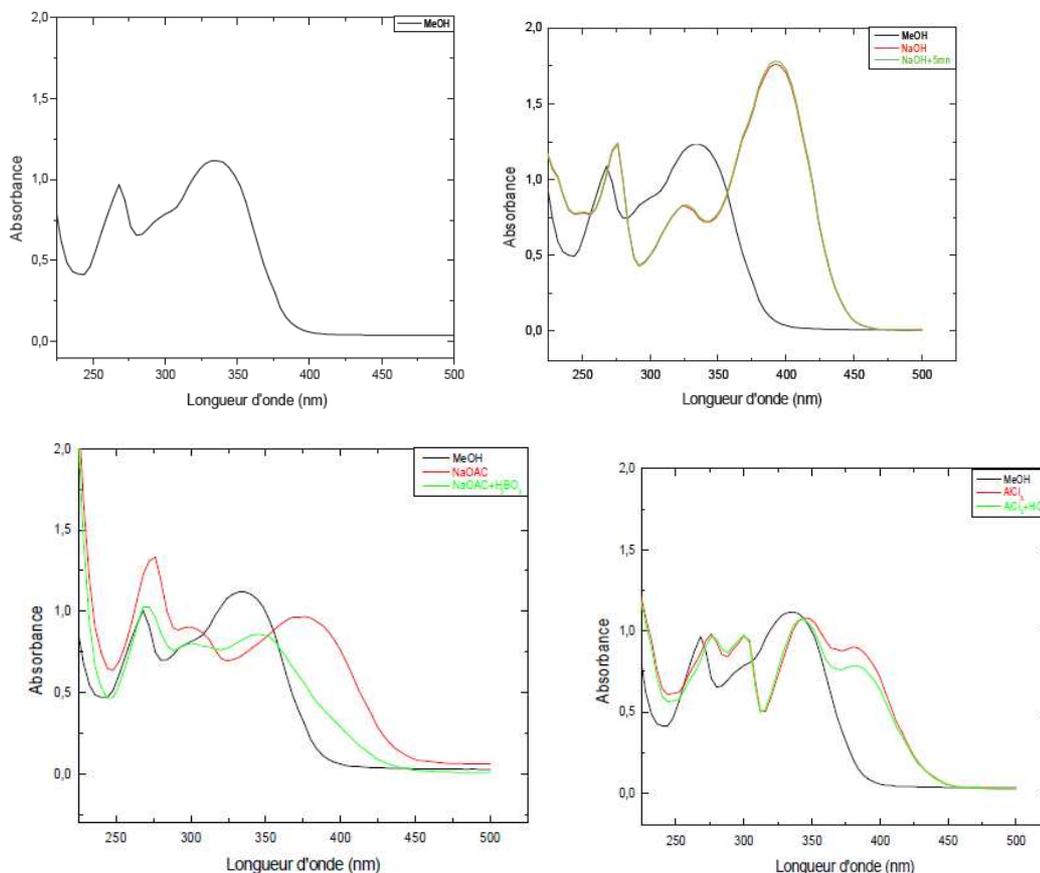


Figure-28: spectres d'absorption UV-visible du composé F₁₃₋₂.

Le spectre de masse en impact électronique EI-MS a donné un pic $[M]^+$ à $m/z = 270$ ce qui correspond à la formule $C_{15}H_{10}O_5$. Ce composé possède donc 3 groupements hydroxyles. Ces derniers se trouvent en position 5, 7 et 4' (spectre UV-visible), ce qui nous permet d'identifier ce composé comme étant l'apigénine. La fragmentation du spectre de masse du composé F₁₃₋₂ confirme que ce composé est dihydroxylé en A et monohydroxylé en B, comme le montre le tableau-33. Le spectre de masse de ce composé présente des artéfacts dont l'origine n'a pu être déterminée.

Tableau-33: Fragmentation du produit F₁₃₋₂

Pics fragments	<i>m/z</i>
[M] ⁺	270
[M-CO] ⁺	242
[A ₁] ⁺	152
[A ₁ -CO] ⁺	124
[B ₁] ⁺	118

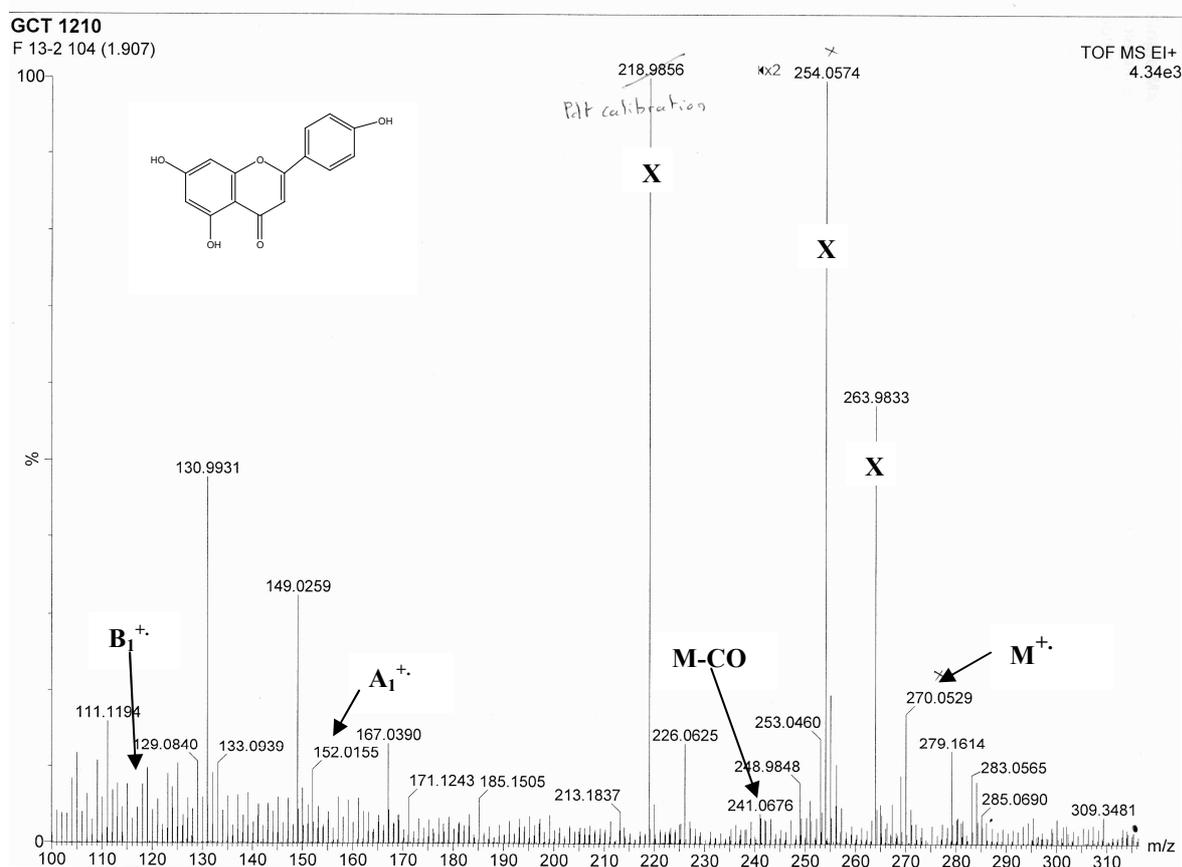


Figure-29 : Spectre de masse du produit F₁₃₋₂.

Le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO-*d*₆ à 250 MHz (tableau-34, figures 30 et 31) montre la présence de 2 doublets d'intégration 1H chacun à 6,4 et 6,2 ppm de même constante de couplage ($J = 1,2$ Hz) caractéristiques des protons méta couplés (H-8 et H-6), deux autres doublets d'intégration 2H chacun à 7 et 6,9 ppm avec une constante de couplage identique ($J = 9$ Hz) caractéristiques des protons en couplage ortho attribués aux protons H-2', 6' et H-3', 5', un singulet d'intégration 1H à 6,5 ppm attribué au proton H-3.

Tableau-34: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit F₁₃₋₂.

δ ppm	Intégration	multiplicité	Constante de couplage	Attribution
6,2	1H	d	1,2	H-6
6,4	1H	d	1,2	H-8
6,5	1H	s	-	H-3
6,9	2H	d	9	H-3' et H-5'
7	2H	d	9	H-2' et H-6'

* : spectre enregistré dans le DMSO-*d*₆.

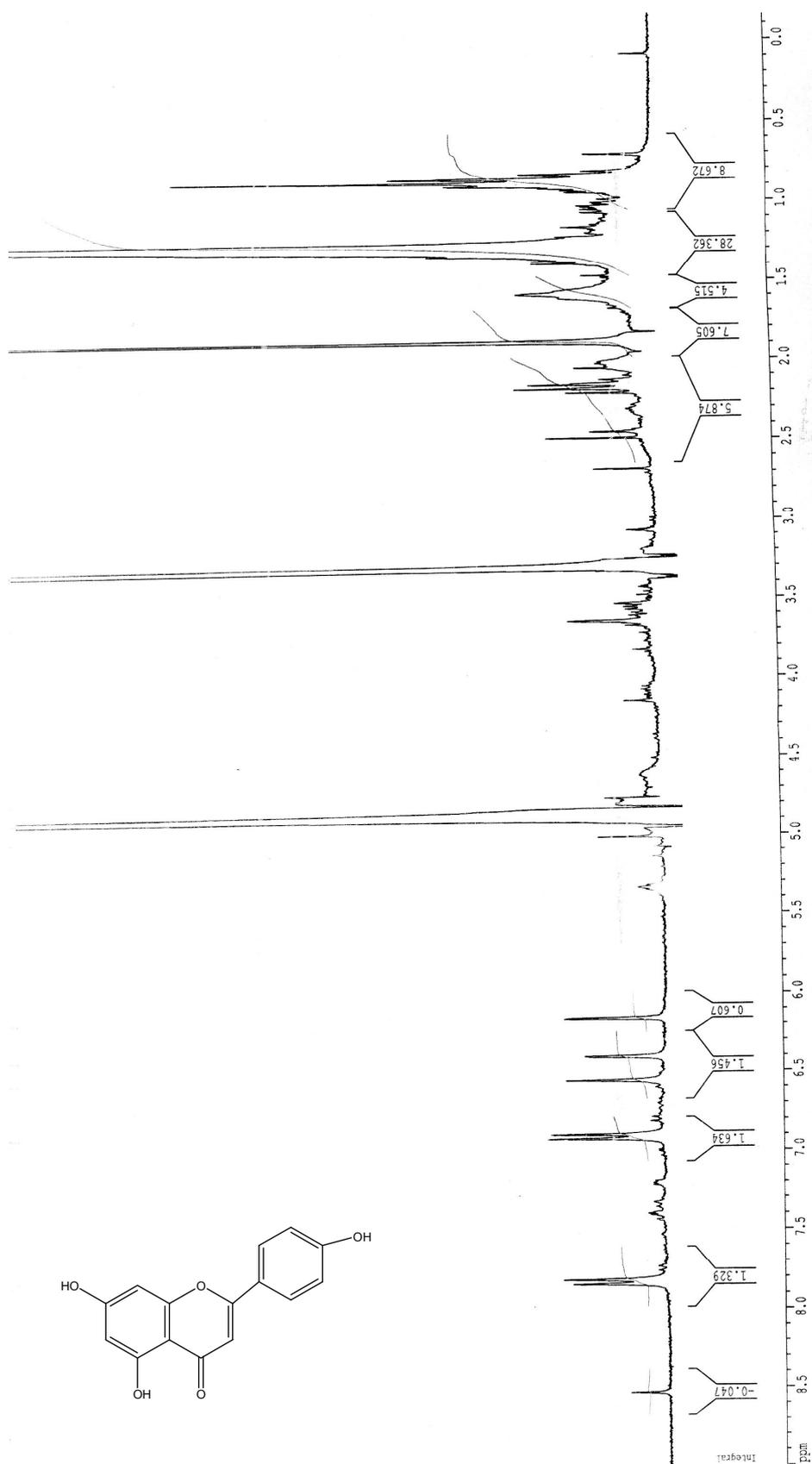


Figure-30: Spectre RMN-H¹ (250MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du produit F₁₃₋₂

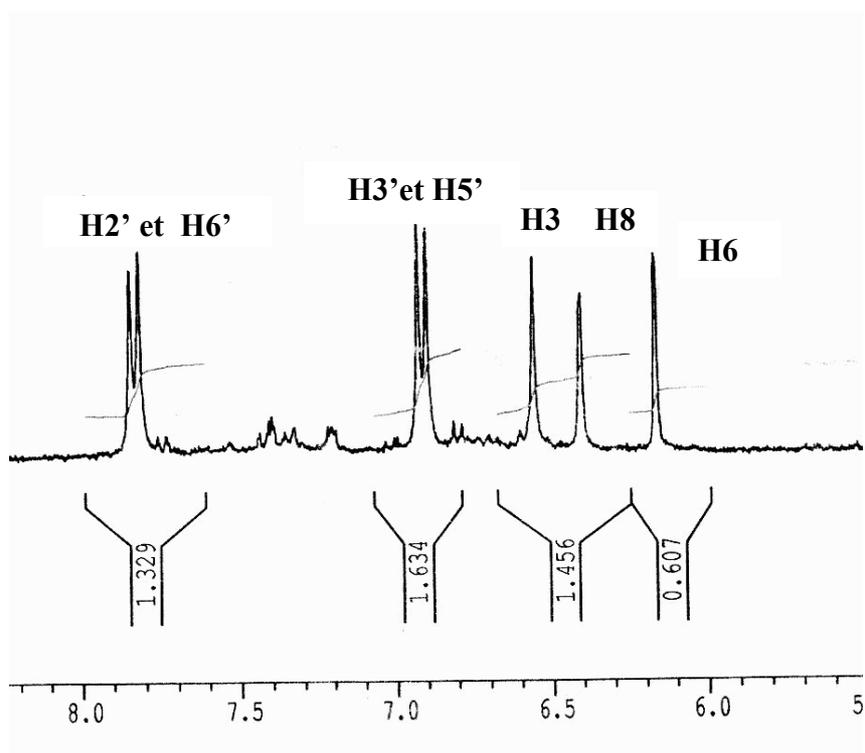
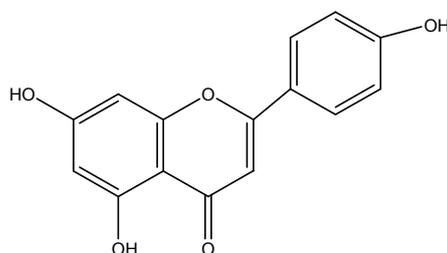


Figure-31 : Etallement du spectre RMN-H¹ du produit F₁₃₋₂

Les spectres UV en présence des différents réactifs ainsi que les spectres RMN-H¹ et EI-MS du produit F₁₃₋₂ nous oriente vers la structure: 5, 7, 4'-trihydroxyflavone (apigénine).



5, 7, 4'-trihydroxyflavone (apigénine).

V-2-2-1-3- Elucidation structurale du composé F_{a-p1} :

La fluorescence bleue montre que ce composé peut être un acide phénol ou une isoflavone. Les valeurs de Rf sur cellulose dans les systèmes BAW 4 / 1 / 5 (0,82) et AcOH 15% (0.62) montrent que ce produit possède deux fonctions une lipophile et l'autre hydrophile (tableau-35).

Tableau-35: Données chromatographiques du composé F_{a-p1} .

système	BAW 4 / 1 / 5	AcOH 15 %
Rf	0,82	0,62
Fluorescence	Bleue	

Le spectre UV-visible du composé F_{a-p1} enregistré dans le méthanol (figure-32) montre deux bandes d'absorption à 225 et 335 nm. L'absence d'une bande entre 245 et 280 nm montre que ce composé n'est pas un flavonoïde

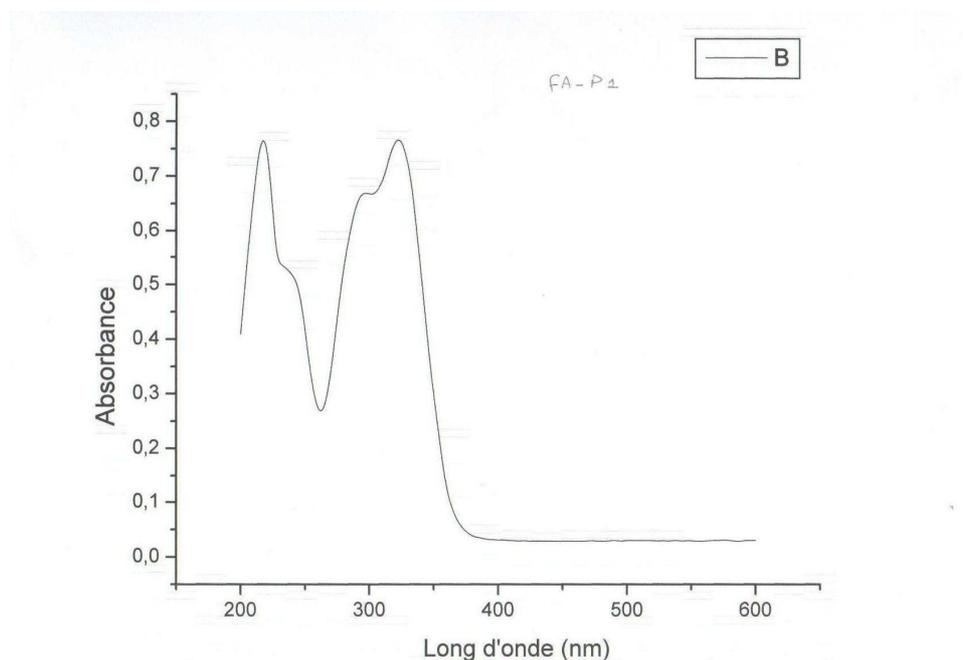


Figure-32 : Spectre d'absorption UV-visible du produit F_{a-p1} .

Le spectre de masse en impact électronique EI⁺-MS (figure- 33) a donné un pic moléculaire [M]⁺ à $m/z = 180$ et un autre pic quasi moléculaire [M+H]⁺ à $m/z = 181$ ce qui correspond à la formule C₉H₈O₄. Ce composé présente donc six insaturations. Selon sa fluorescence, son comportement chromatographique, l'allure de son spectre UV-Visible dans le méthanol ainsi que son spectre RMN proton, ce composé ne peut être qu'un acide phénol.

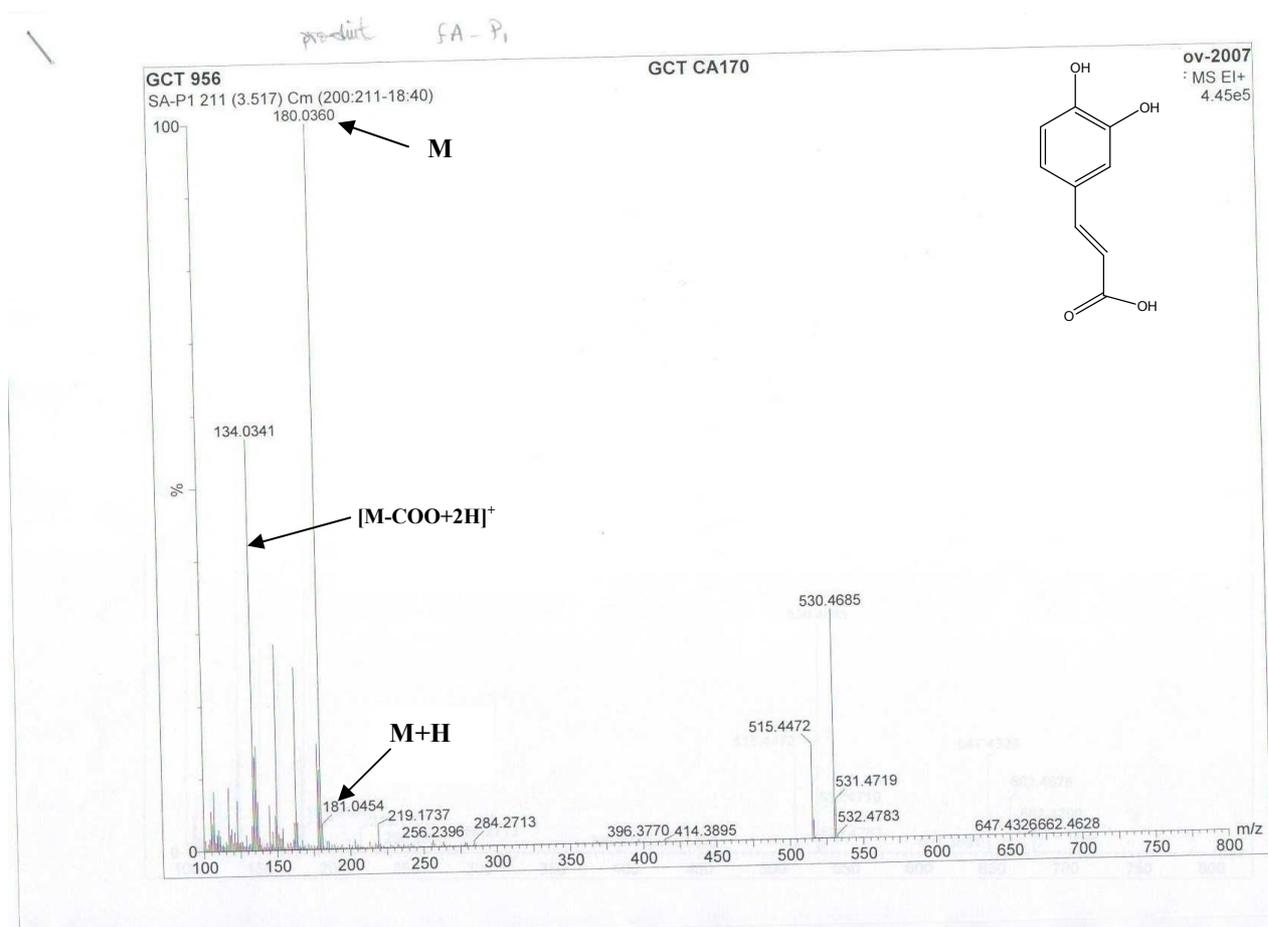


Figure-33 : Spectre EI-MS du produit Fa_{p1}.

Le spectre RMN proton enregistré dans le DMSO-*d*₆ à 250 MHz (tableau-36, figure-34 et 35) montre la présence de 2 doublets d'intégration 1H chacun à 6,2 et 7.6 ppm de même constante de couplage ($J = 15,4$ Hz) correspondants respectivement aux protons oléfiniques en position trans. La présence d'un doublet dédoublé d'intégration 1H à 7 ppm montre que ce proton est ortho couplé à un premier proton avec une constante de couplage de 8,1 Hz et méta couplé à un second proton avec une constante de couplage de 2,1 Hz. Le doublet d'intégration 1H à 6,8 ppm correspond au premier proton en position ortho ($J = 8,1$ Hz) par rapport au précédent alors que le second doublet d'intégration 1H à 7,2 ppm ($J = 2.1$ Hz) correspond au proton en position méta.

Tableau-36: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit F_{a-p1}.

δ ppm	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage	Attribution
6,2	1H	d	15,4	H-8
6,8	1H	d	8,1	H-5
7	1H	dd	8,1 et 2,1	H-6
7,2	1H	d	2,1	H-2
7,6	1H	d	15,4	H-7

* : spectre enregistré dans le DMSO-d₆.

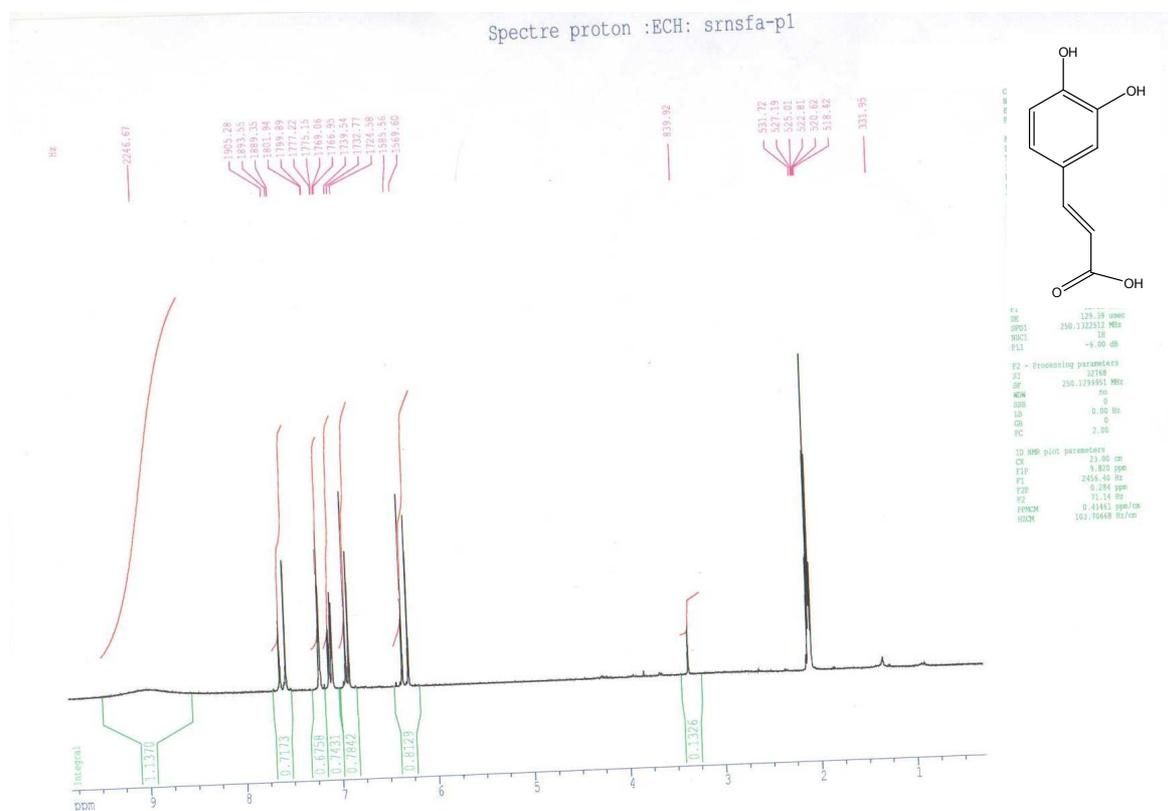


Figure-34: Spectre RMN-H¹ (250MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du produit F_{a-p1}.

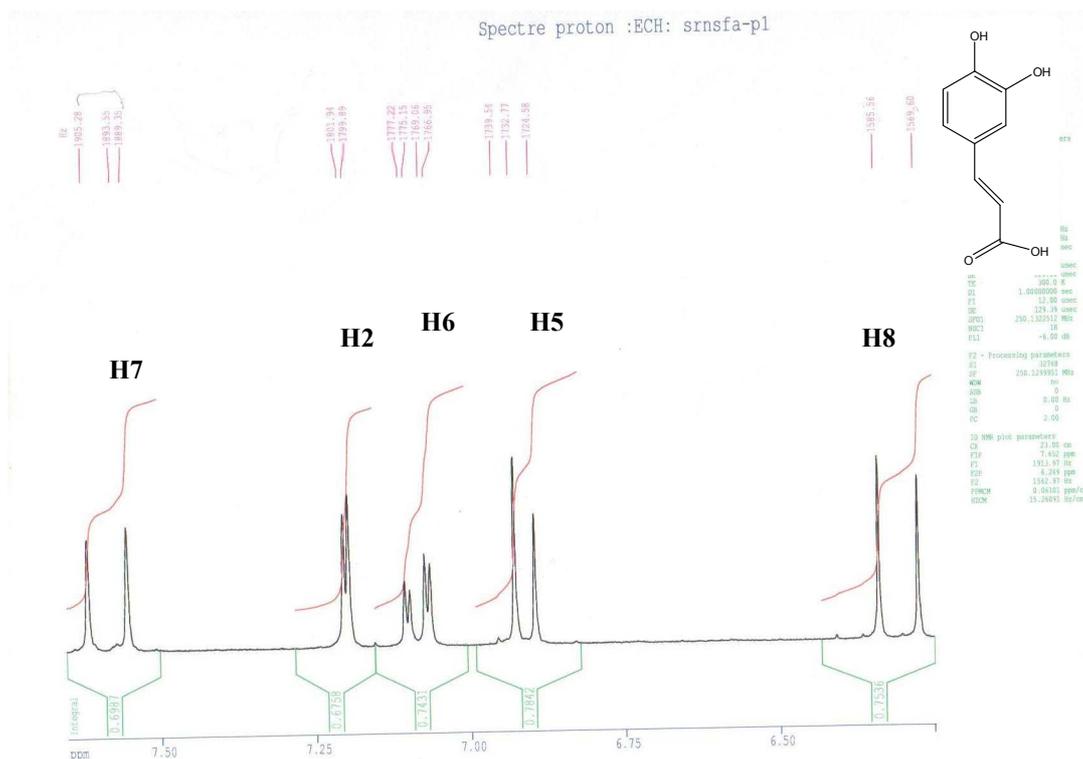


Figure-35 : Etalement du spectre RMN-H¹ du produit Fa-p1.

La structure de cette molécule n'a pu être confirmée que par le spectre RMN-C¹³ et J-modulé qui ont montré la présence de deux hydroxyles sur le noyau aromatique et une fonction carboxylique (figure-35 et 36). Les données relatives à ces spectres sont reportées dans le tableau-37. Ces résultats nous orientent vers la structure suivante : acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique).

Tableau-37: Données RMN-C¹³ du produit Fa.p1.

Carbone	Déplacement chimique
1	126,7
2	114,2
3	145,0
4	147,7
5	115,4
6	121,5
7	145,3
8	114,8
9	167,2

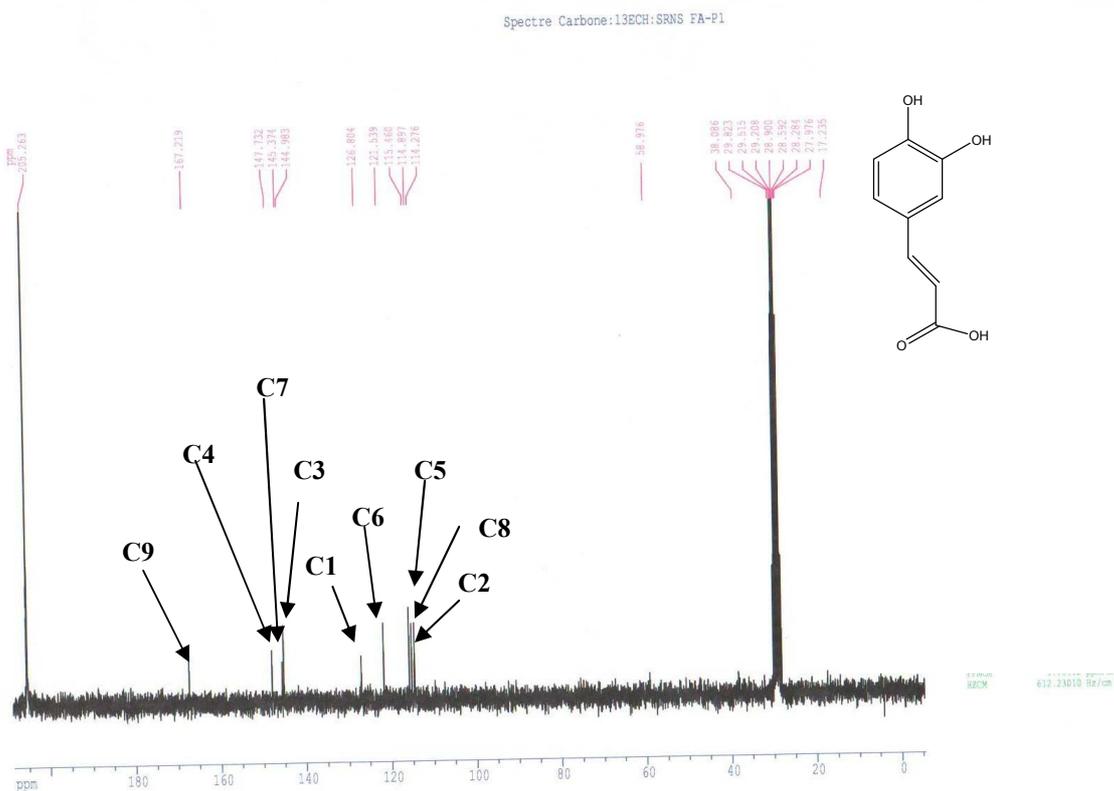


Figure-36 : Spectre RMN-C¹³ (63MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du produit Fa.p1.

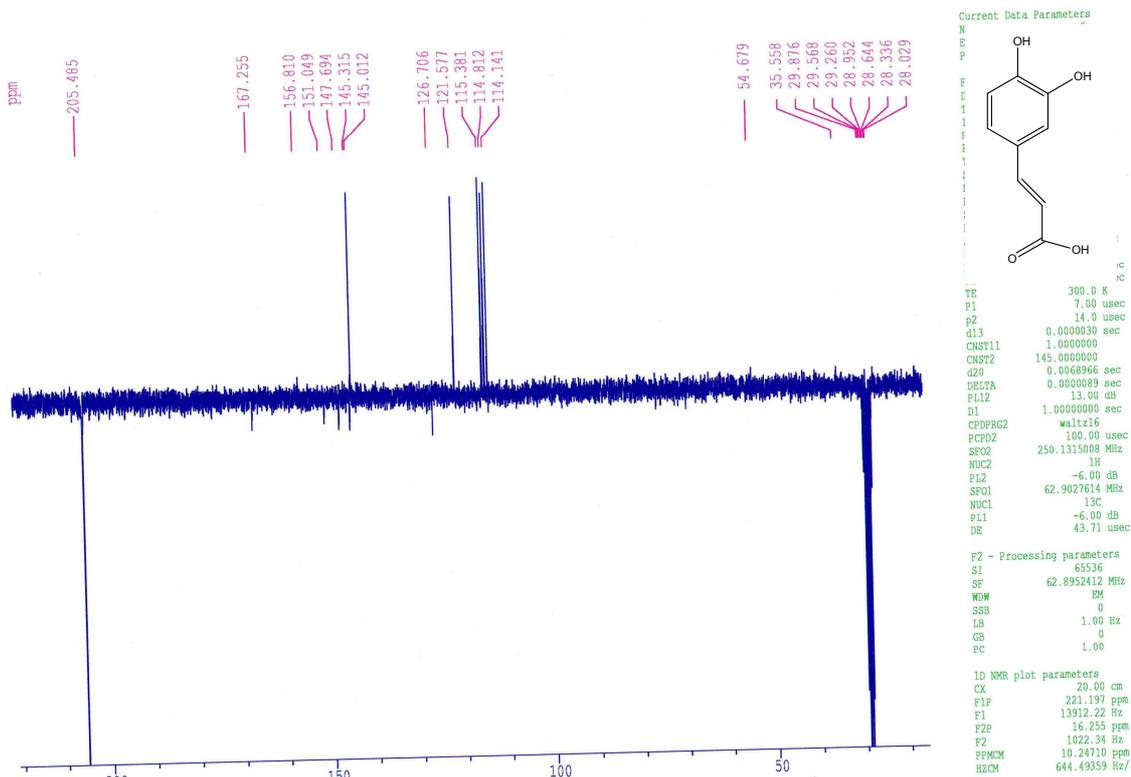
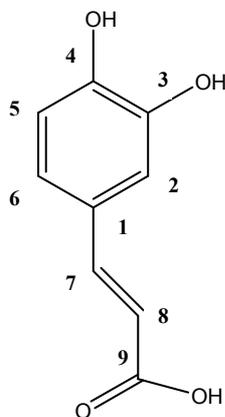


Figure-37 : Spectre J-mode (63MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du produit Fa_{p1}.

Les spectres RMN-H¹, RMN-C¹³, J-modulé et le spectre EI-MS du produit Fa_{p1} nous orientent vers la structure : Acide -3,4- dihydroxycinnamique (acide caféique). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Flamini et al 2001, Gil et al 2003 et Lim 2007.



Acide -3,4- dihydroxycinnamique (acide caféique)

V-2-2-1-4- Elucidation structurale du composé F_{e-1} :

La fluorescence violette en UV et les valeurs des Rf de ce composé sur cellulose dans les systèmes BAW (4 / 1 / 5 ; Rf = 0,88) et AcOH (15 % ; Rf = 0) sont en faveur d'une structure aglycone. Le spectre UV-visible de ce composé enregistré dans le méthanol (tableau-39, figure-38) présente deux bandes d'absorption à 351 nm et 257 nm caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.

Le déplacement bathochrome de 50 nm de la bande I du spectre enregistré en présence de NaOH par rapport à celui du méthanol, sans diminution de son intensité est en faveur d'un OH libre en position 4'. L'absence d'une nouvelle bande vers 325 nm du spectre en présence de NaOH montre que l'hydroxyle en 7 est substitué.

Le déplacement bathochrome de 35 nm de la bande I du spectre enregistré en présence de AlCl₃ / HCl par rapport au spectre méthanol indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5. L'absence de déplacement hypsochrome de la bande I du spectre AlCl₃ / HCl par rapport au spectre AlCl₃ montre l'absence d'un système ortho di-OH sur le noyau B. La RMN du proton confirmera le nombre de substituant sur les noyaux A et B.

Tableau-38: Données chromatographiques du composé F_{e-1} .

Système	BAW 4 / 1 / 5	AcOH 15 %
Rf	0,88	0
Fluorescence	Violette	

Tableau-39: maximums d'absorption du composé F_{e-1} dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	351	257	-
NaOH	401	284	-
NaOAc	385	280	-
NaOAc + H ₃ BO ₃	386	278	-
AlCl ₃	386	271	-
AlCl ₃ + HCl	386	271	-

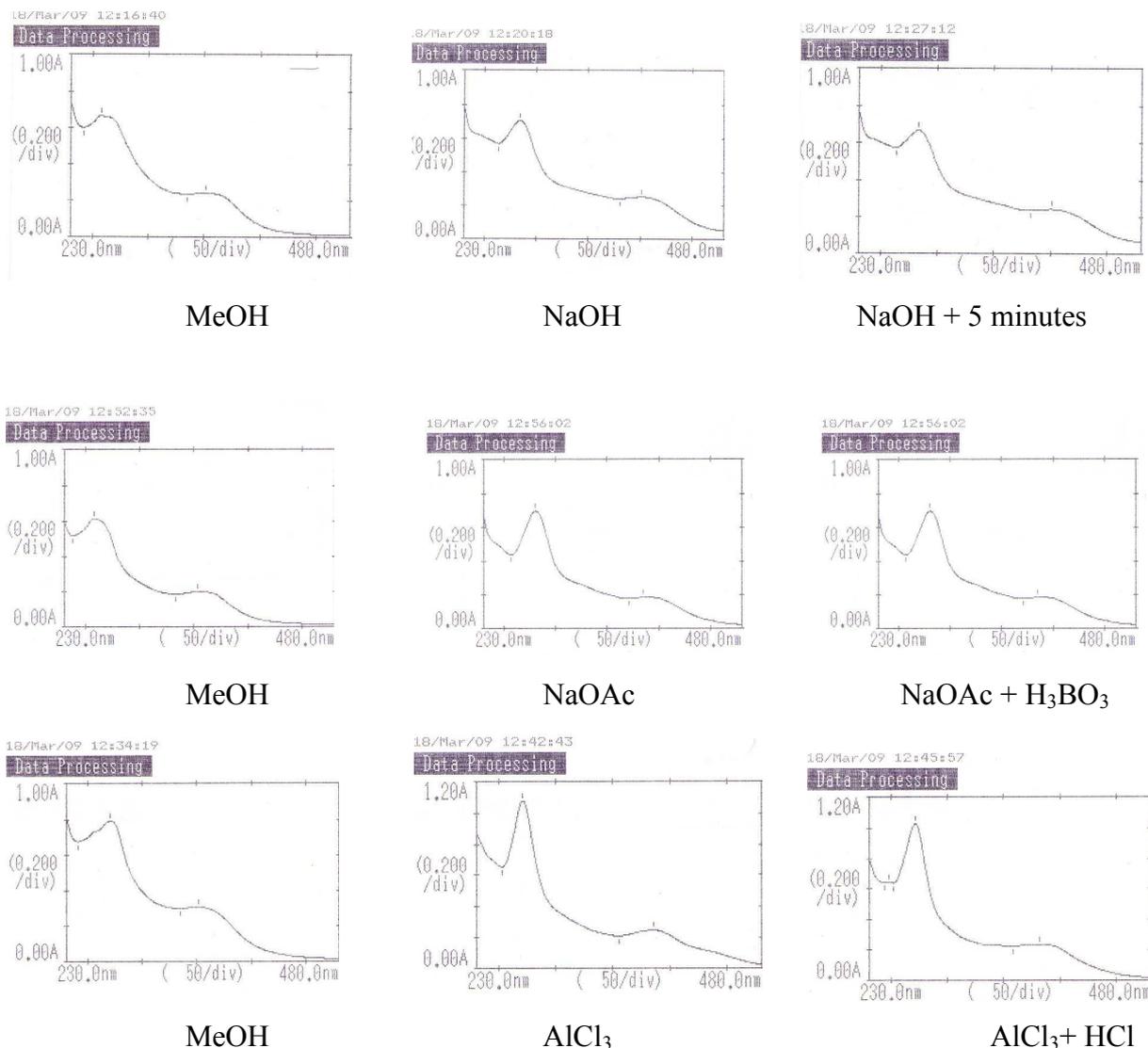


Figure-38 : Spectres d'absorption UV-visible du produit F_{e-1} .

Le spectre RMN du proton enregistré dans le CD_3OD à 300 MHz montre la présence de 2 doublets d'intégration 1H chacun à 6,4 et 6,2 ppm ($J = 1,9$ Hz) caractéristiques des protons en couplage méta H-8 et H-6. Les deux doublets à 7,2 et 6,8 ppm ($J = 8,9$ Hz) d'intégration 2H chacun sont caractéristiques des protons en couplage ortho, attribués aux protons H-2', 6' et H-3', 5' respectivement. Les deux singulets d'intégration 3H à 3,7 et 3,8 ppm sont attribués aux groupements méthoxyle (tableau-40, figure-39 et 40).

Tableau-40: Données RMN- H^1 (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit F_{e-1} .

δ ppm	intégration	Multiplicité	Constante de couplage	Attribution
3,7	3H	s	-	OMe
3,8	3H	s	-	OMe
6,2	1H	d	1,9	H-6
6,4	1H	d	1,9	H-8
6,8	2H	d	8,9	H-3' et H-5'
7,2	2H	d	8,9	H-2' et H-6'

* : spectre enregistré dans le CD_3OD

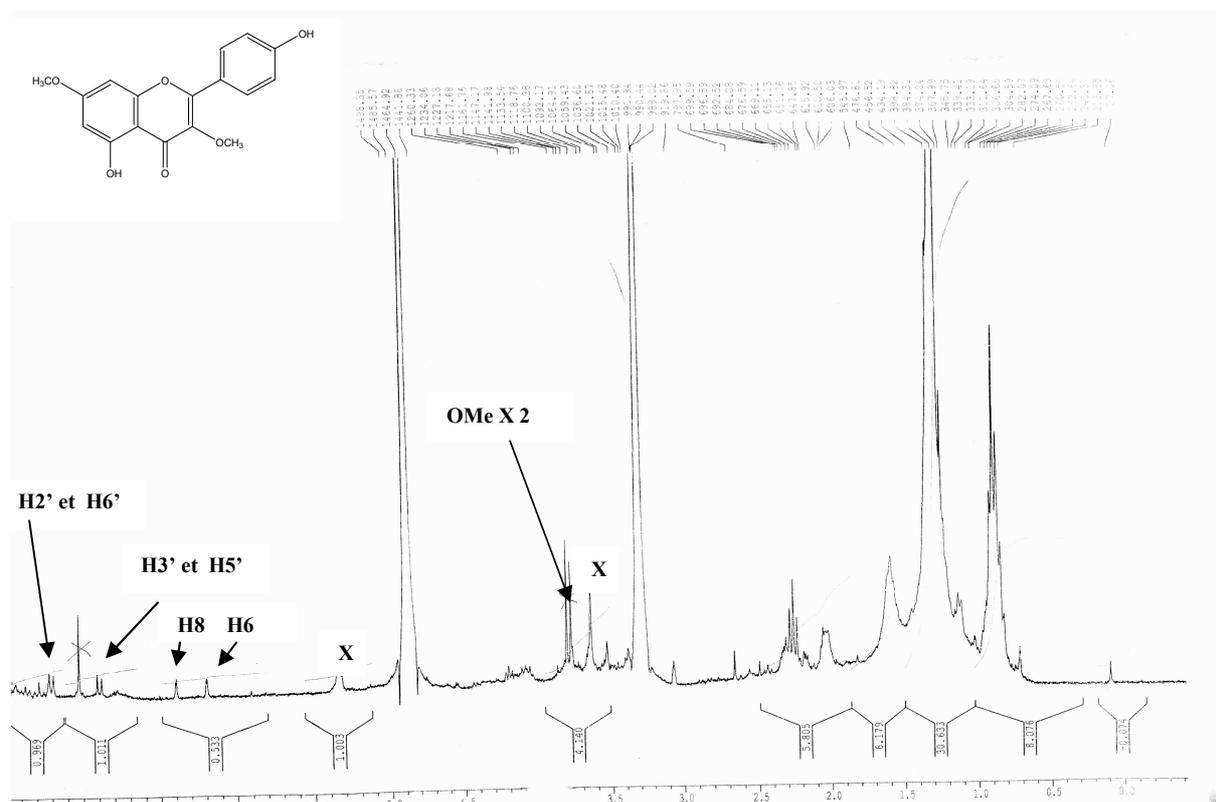


Figure-39: Spectre RMN- H^1 (300MHz, CD_3OD , δ ppm) du produit $Fe-1$.

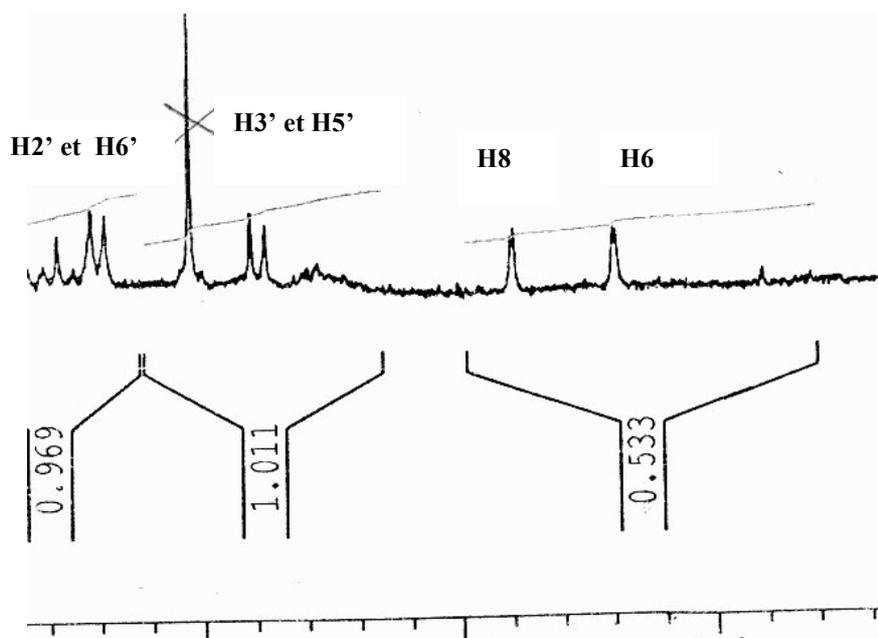
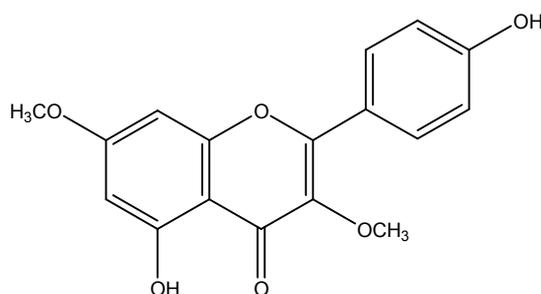


Figure-40: étalement du spectre RMN-H¹ du produit Fe-1.

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que le spectre RMN du proton du composé F_{e-1} nous oriente vers la structure : 5,4'-dihydroxy-3, 7-diméthoxyflavone (Kumatakenin). Le peu de produit obtenu ne nous a pas permis de faire une analyse plus approfondie par RMN carbone et RMN bidimensionnelle ainsi que la spectrométrie de masse.



5,4'-dihydroxy-3, 7-diméthoxyflavone (Kumatakenin).

V-2-2-1-5- Elucidation structurale du composé SCI-F 6-9 :

La fluorescence violette en UV de ce composé et les valeurs des Rf sur polyamide DC6 dans les systèmes S1 (toluène / méthylethylcétone / méthanol 4 / 3 / 3 ; Rf = 0,92) et S2 (eau / méthylethylcétone / méthanol / acethylacétone 13 / 3 / 3 /1, Rf = 0) sont en faveur d'une structure aglycone. Le spectre UV-visible (tableau-42, figure-41) présente deux bandes d'absorption à 281 et 330 nm caractéristiques d'une structure flavone.

L'effet bathochrome de 45 nm de la bande I du spectre enregistré en présence de NaOH par rapport au spectre méthanolique, sans diminution de son intensité est en faveur d'un hydroxyle libre en 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm est en faveur d'un OR en position 7. Cette substitution est confirmée par l'absence de déplacement de la bande II du spectre en présence de NaOAc par rapport à celle du spectre méthanolique.

Le déplacement bathochrome de 17 nm de la bande I du spectre NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre méthanolique est en faveur d'un ortho dihydroxylé sur le noyau B. L'effet hypsochrome de 26 nm de la bande I dans le spectre AlCl₃ + HCl par rapport au spectre AlCl₃ confirme la présence d'un ortho dihydroxylé sur le noyau B et indique la présence d'un autre ortho di-OH sur le noyau A. Les hydroxyles du noyau A ne peuvent être qu'on position 5 et 6 : le spectre AlCl₃ + HCl est identique au spectre méthanolique. De plus, la position 7 est substituée.

Tableau-41: Données chromatographiques du composé SCI-F6-9.

Système	S1	S2
Rf	0,92	0
Fluorescence	Violette	

Tableau-42: maximums d'absorption du composé SCI-F6-9 dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	330	281	-
NaOH	375	270	-
NaOAC	327	280	-
NaOAC + H ₃ BO ₃	347	265	-
AlCl ₃	354	266	-
AlCl ₃ + HCl	328	281	-

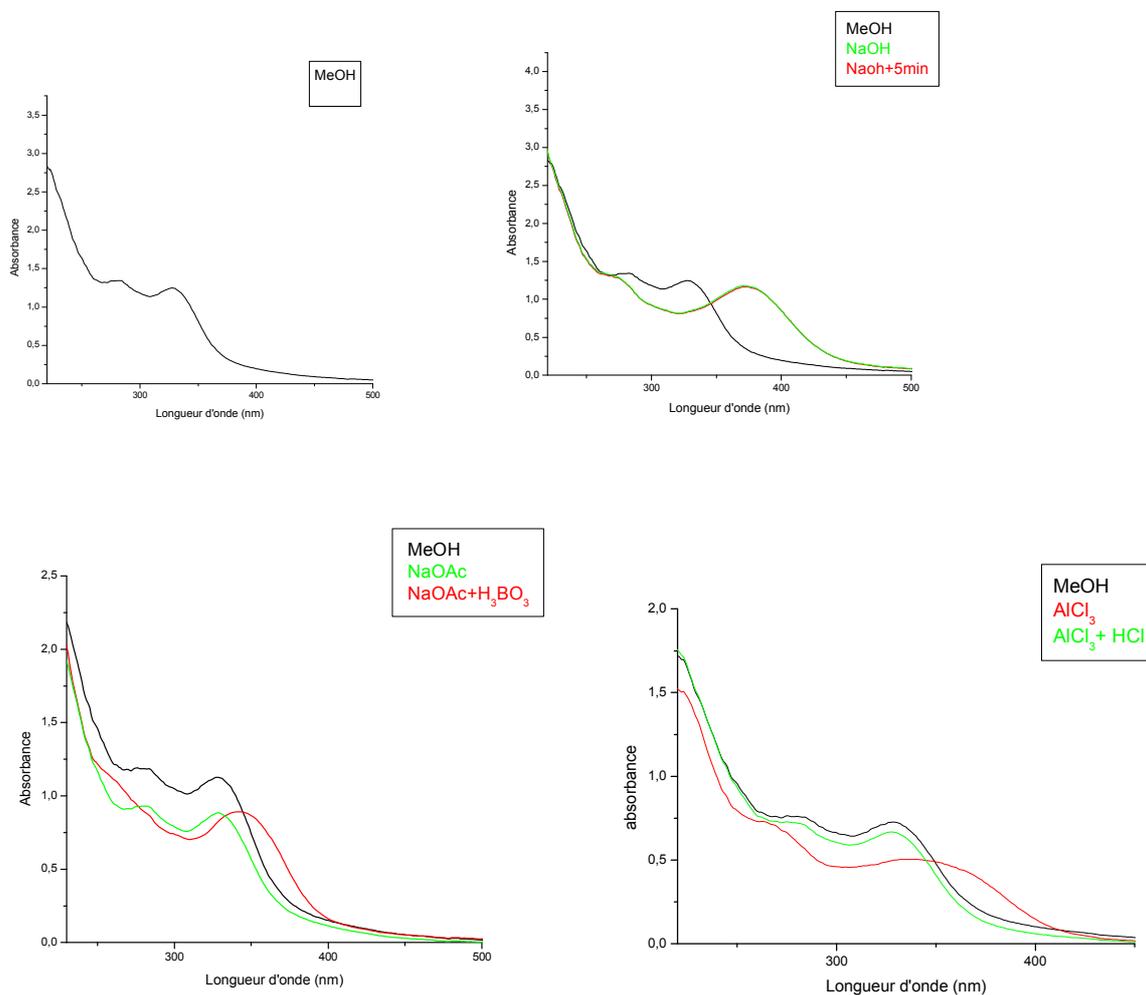
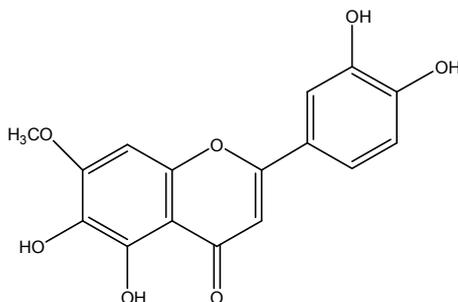


Figure-41: Spectre d'absorption UV-visible du produit SC1-F6-9.

Les résultats de l'analyse spectrale UV-visible en présence des différents réactifs du composé SC1-F6-9 nous orientent vers la structure : 5, 6, 3', 4'-tétrahydroxy-7-méthoxyflavone.



5, 6, 3', 4'-tétrahydroxy-7-méthoxyflavone

V-2-3-Identification des composés de l'extrait 1 / 1 :

V-2-3-1- Elucidation structurale du composé F₁₃ :

La fluorescence violette en UV de ce composé et les valeurs des R_f sur polyamide DC6 dans les systèmes S1 (toluène / méthylethylcétone / méthanol 4 / 3 / 3, R_f = 0,94) et S2 (eau / méthylethylcétone / méthanol / acethylacétone 13 / 3 / 3 / 1, R_f = 0) sont en faveur d'une structure de type aglycone. Le spectre UV-visible (tableau-44, figure-42) présente deux bandes d'absorption à 267 et 321 nm caractéristiques d'une flavone.

Le spectre méthanol enregistré en présence de NaOH présente un effet bathochrome de 64 nm de la bande I par rapport au spectre méthanol, avec diminution de l'intensité en faveur d'une substitution en position 4' (4'-OR).

L'effet bathochrome de 10 nm de la bande I dans le spectre enregistré dans le NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre méthanolique indique l'absence d'un système ortho di-OH sur le noyau B. Cette hypothèse est confirmée par l'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I du spectre AlCl₃ + HCl par rapport à celle du spectre enregistré dans AlCl₃ avec possibilité d'un système ortho dihydroxylé sur le noyau A.

L'effet bathochrome de 19 nm de la bande I entre le spectre enregistré dans l'AlCl₃ + HCl par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5 avec une substitution OR en position 6.

Tableau-43: Données chromatographiques du composé F₁₃.

Système	S1	S2
R _f	0,94	0
Fluorescence	Violette	

Tableau-44: maximums d'absorption du composé F₁₃ dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	321	267	-
NaOH	385	267	329
NaOAc	331	272	-
NaOAc + H ₃ BO ₃	331	272	-
AlCl ₃	340	299	-
AlCl ₃ + HCl	340	299	-

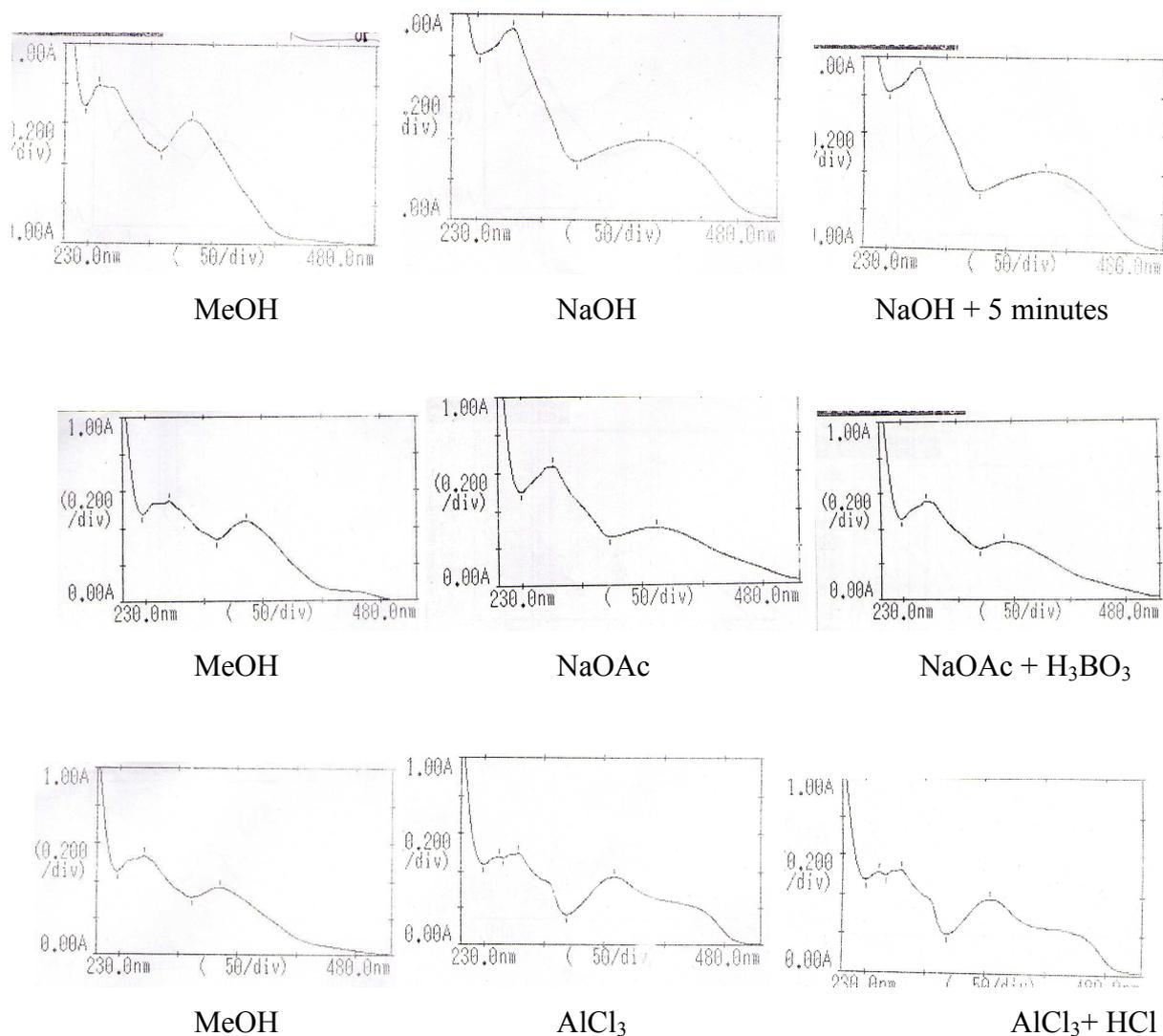


Figure-42 : Spectres d'absorption UV-visible du produit F₁₃.

Le spectre de masse en impact électronique EI-MS (tableau-45 et 46, figure-43) a montré que notre produit est un mélange de deux composés dont les pics moléculaires correspondent respectivement à $[M_1]^+$ à $m/z = 314$ et $[M_2]^+$ à $m/z = 330$. D'après ces valeurs, on peut dire que le composé 1 de masse moléculaire 314 est un dihydroxy-diméthoxyflavone alors que le composé 2 de masse moléculaire 330 est un trihydroxy-diméthoxyflavone.

Le spectre UV en présence des différents réactifs montre la présence d'un méthoxyle en 4' confirmée par le spectre de masse qui donne un fragment $m/z = 133$ correspondant au

noyau B présentant un méthoxyle. Ceci montre que les deux composés présentent un même noyau B. Les pics de fragmentation correspondants au noyau A montrent que le composé 1 ($m/z = 183$) présente deux hydroxyles et un méthoxyle sur le noyau A alors que le composé 2 ($m/z = 199$) présente trois hydroxyles et un méthoxyle. Les pics à $m/z = 183$ et à $m/z = 167$ correspondent respectivement aux fragments du composé 1 $[A_1+H]^+$ et $[A_1-Me]^+$.

Les pics à $m/z = 199$ et à $m/z = 167$ correspondent respectivement aux fragments du composé 2 $[A_2+H]^+$ et $[A_2-OMe]^+$. Les différents fragments des composés 1 et 2 sont représentés dans les tableaux-45 et 46.

Tableau-45: Fragmentation du composé 1.

Pics fragments	m/z	%
$[M_1]^+$	314	60
$[M_1-CH_3]^+$	299	45
$[M_1-CH_3-CO]^+$	271	50
$[A_1+H]^+$	183	6
$[A_1-CH_3]^+$	167	56
$[B_1+H]^+$	133	26

Tableau-46: Fragmentation du composé 2.

Pics fragments	m/z	%
$[M_2]^+$	330	94
$[M_2-CH_3+H]^+$	316	62
$[M_2-CH_3-CO]^+$	287	100
$[A_2+H]^+$	199	6
$[A_2-OMe]^+$	167	56
$[B_2+H]^+$	133	26

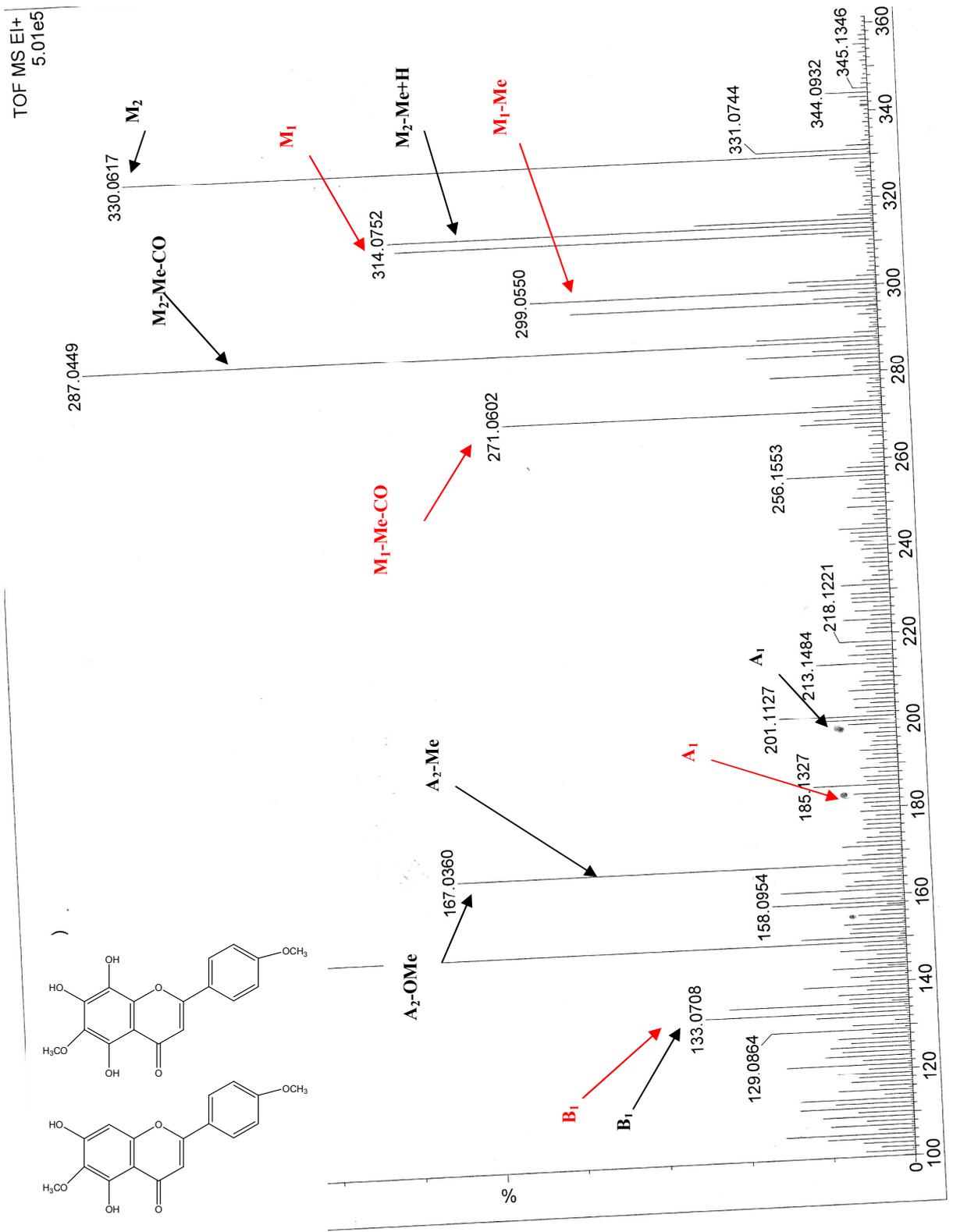


Figure-43 : Spectre de masse du composé F₁₃

Le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO-*d*₆ à 250 MHz du composé 1 (figure-44 et 45) montre la présence de deux singulets de multiplicité 3H à 3,7 et 3,8 ppm dont le premier est en position 6 confirmé par le spectre HMBC qui présente une corrélation entre le méthoxy dont le déplacement chimique est de 3,7 ppm avec le carbone en 6. Ceci montre que les deux composés 1 et 2 sont tout les deux méthoxylés en position 6. Le singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,8$ ppm est attribué au proton H-3. Les deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta = 7$ ppm et $\delta = 8$ ppm avec une même constante de couplage ($J = 8,9$ Hz) sont caractéristiques des protons en couplage ortho, attribués aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement. Le singulet d'intégration 1H à $\delta = 12,8$ ppm est attribué à l'hydroxyle en position 5. Ceci confirme que la structure du composé 1 est : 5, 7-dihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone (pectolarigenin). Le composé 2 possède un hydroxyle en plus par rapport au composé 1. Cet hydroxyle ne peut être qu'en position 8. Ce qui a été confirmé par le spectre UV-visible enregistré en présence d'AlCl₃ + HCl. Le spectre RMN proton du composé 2 présente un singulet à $\delta = 13$ ppm correspondant à l'hydroxyle en 5. La structure du composé 2 ne peut être que 5, 7, 8-trihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone. Les données RMN du proton des composés 1 et 2 sont représentées dans les tableaux 47 et 48.

Tableau-47: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé 1.

δ ppm	intégration	multiplicité	Constante de couplage	Attribution
3,7	3H	s	-	OMe
3,8	3H	s	-	OMe
6,5	1H	s	-	H-8
6,8	1H	s	-	H-3
7	2H	d	8,9	H-3' et H-5'
8	2H	d	8,9	H-2' et H-6'
10,6	1H	s	-	-OH
12,8	1H	s	-	5-OH

* : spectre enregistré dans le DMSO-*d*₆.

Tableau-48: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé 2.

δ ppm	intégration	multiplicité	Constante de couplage	Attribution
3,7	3H	s	-	OMe
3,8	3H	s	-	OMe
6,8	1H	s	-	H-3
7	2H	d	8,9	H-3' et H-5'
8	2H	d	8,9	H-2' et H-6'
13	1H	s	-	5-OH

* : le spectre est enregistré dans le DMSO-d₆.

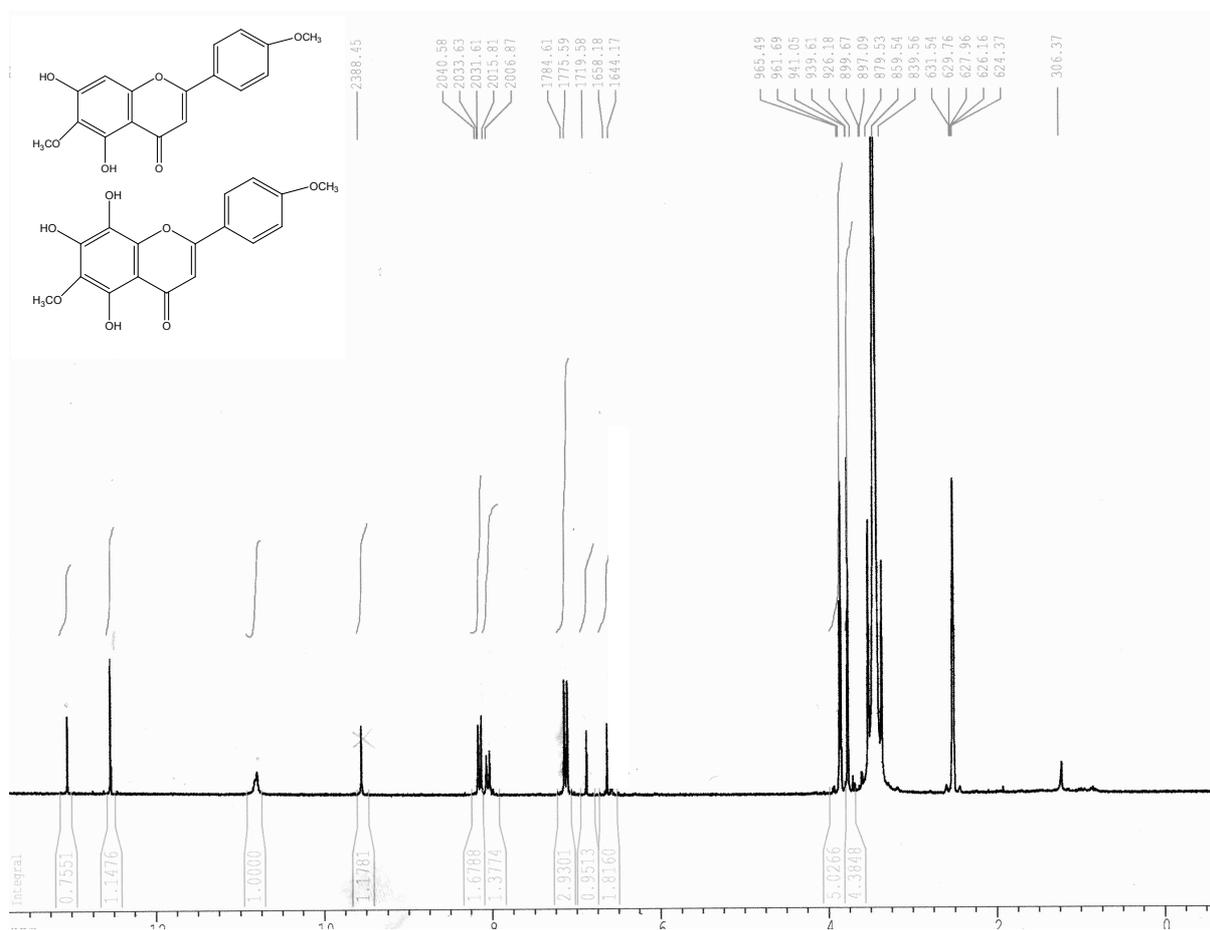


Figure-44 : Spectre RMN-H¹ (250MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé F₁₃

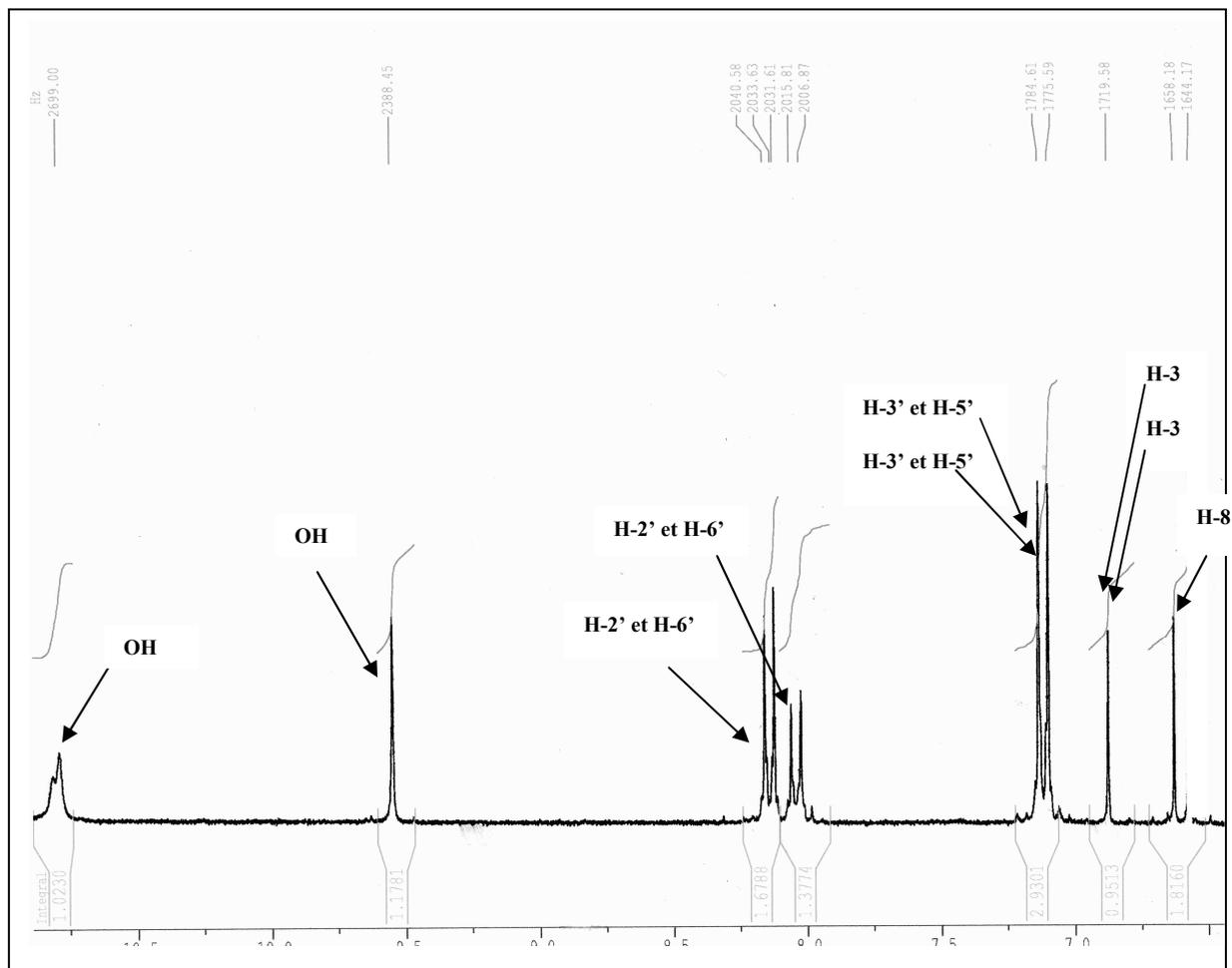


Figure-45 : Etalement du spectre RMN- H^1 du composé F₁₃.

Le spectre COSY (figure-46 et 47) montre des taches de corrélation entre les protons H-2', H-6' et H-3', H-5' ce qui confirme que le composé F13 est un mélange de deux produits.

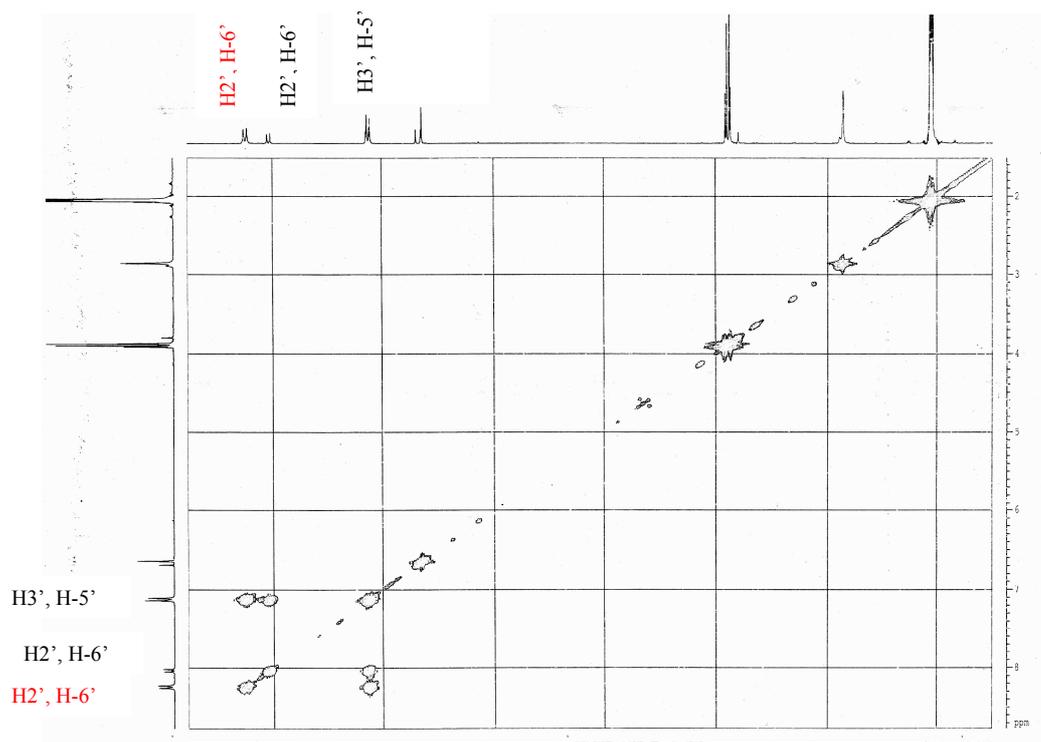


Figure-46 : Spectre COSY (250MHz, DMSO-d₆) du composé F₁₃.

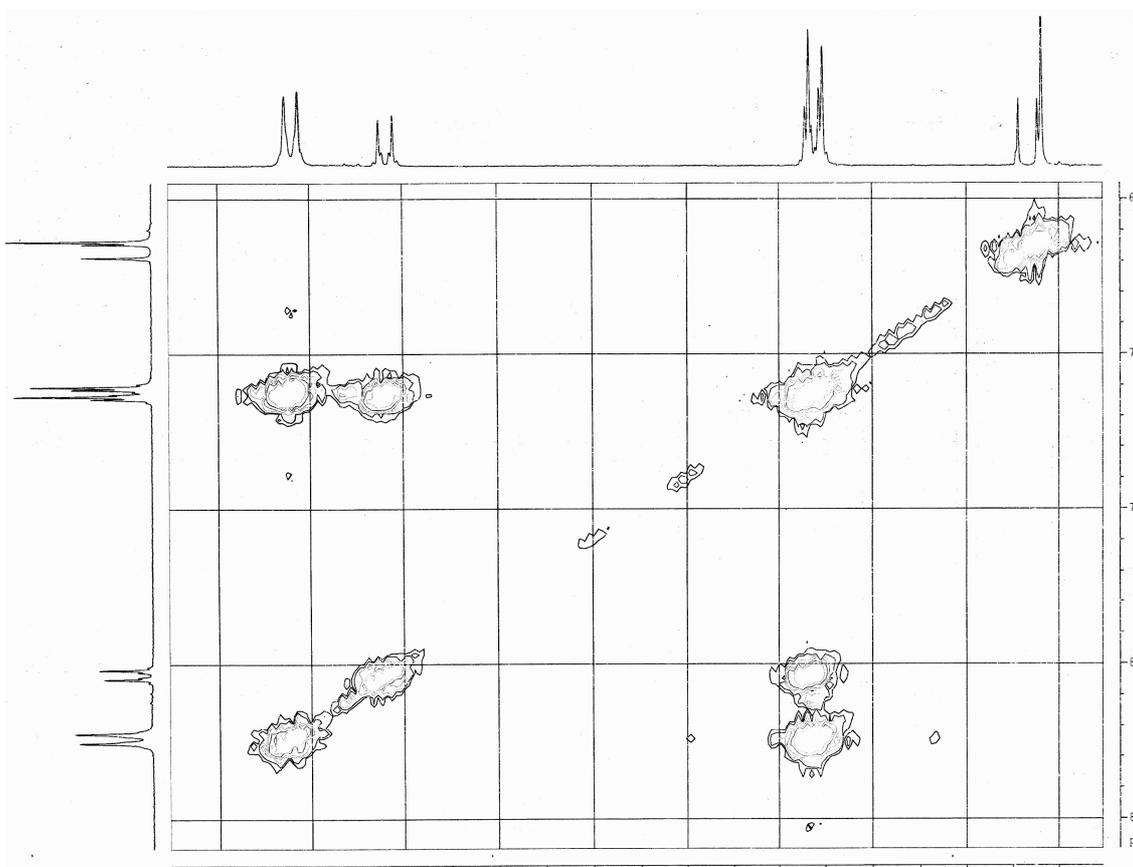


Figure-47: Etagement du spectre COSY du composé F₁₃.

L'analyse du spectre HSQC (figure-48) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- Le H-8 permet l'attribution du signal à $\delta = 94,2$ ppm à l'atome de carbone C-8 du composé 1.
- Les H-3' et H-5' permettent l'attribution du signal à $\delta = 114,8$ ppm aux atomes de carbone C-3' et C-5' du composé 1 et le signal à $\delta = 115,0$ ppm aux atomes de carbone C-3' et C-5' du composé 2.
- Les H-2' et H-6' permettent l'attribution des signaux à $\delta = 128,7$ et $128,8$ ppm aux atome de carbones C-2' et C-6' des composés 1 et 2 respectivement.

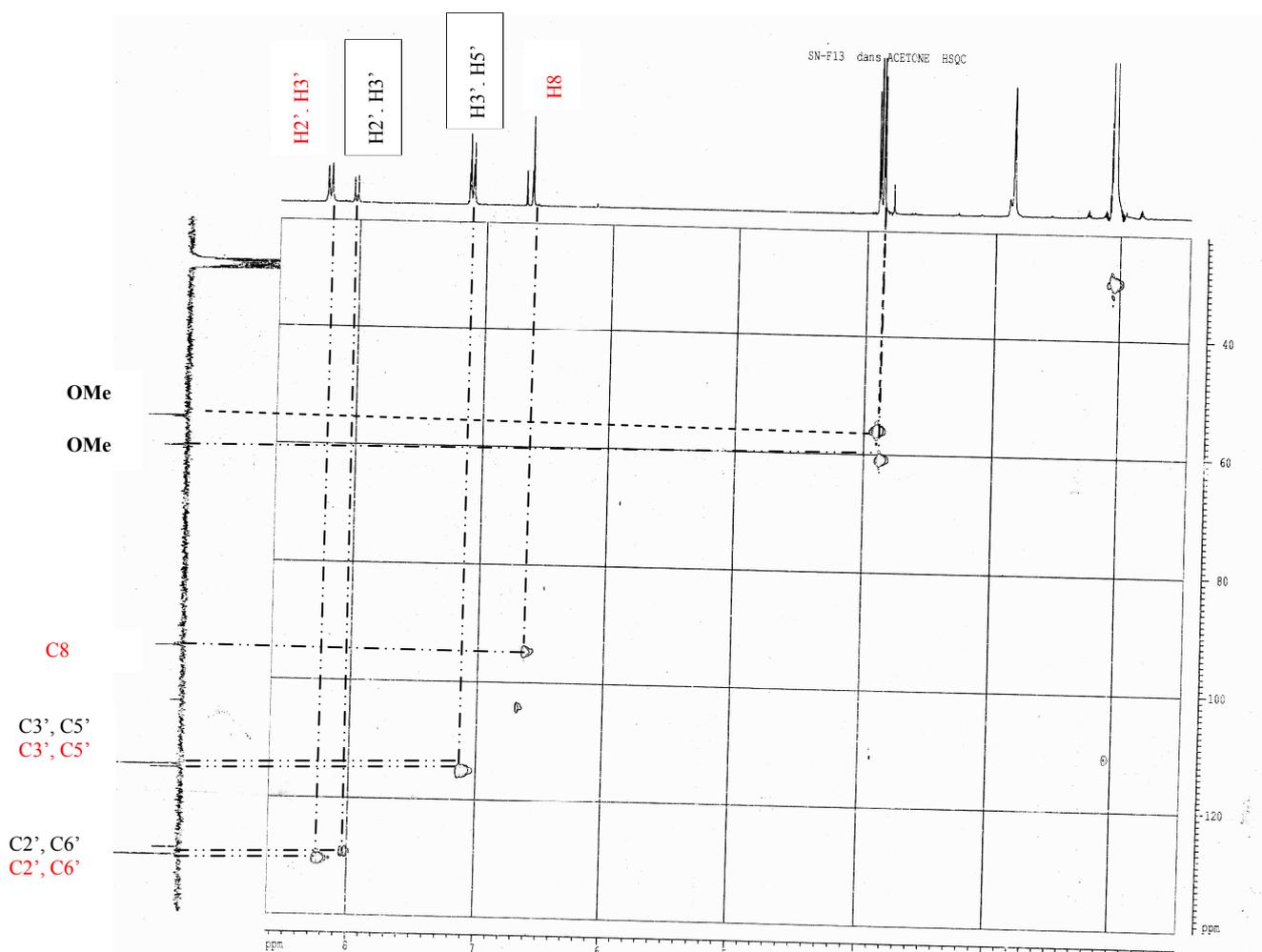


Figure-48 : Spectre HSQC (250MHz, DMSO-d6) du composé F₁₃.

L'étude du spectre HMBC (figure-49) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

- Le proton H-8 donne quatre taches de corrélation :

-La première avec l'atome de carbone à $\delta = 104,1$ ppm attribué à C-10.

-La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 131,6$ ppm qui ne peut être que le C-6. Ce même atome de carbone montre une tache de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,84$ ppm ($\delta_C = 60,4$ ppm), ceci mène à localiser ce groupement sur le carbone C-6 des composés 1 et 2. Cette même tâche correspond aussi à une corrélation entre le H-8 et un atome de carbone à $\delta = 129,7$ ppm attribué au C-8 du composé 1.

-La troisième avec l'atome de carbone à $\delta = 151,9$ ppm attribué à C-9.

-La quatrième avec l'atome de carbone à $\delta = 157,2$ ppm attribué à C-7.

- Les protons H-3' et H-5' montrent deux tâches de corrélation :

-La première avec les atomes de carbone à $\delta = 114,4$ et $115,0$ ppm qui ne peuvent être attribués qu'aux carbones C-3' et C-5' des composés 1 et 2 respectivement.

-La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 123,7$ ppm attribué au carbone C-1'.

- Les protons H-2' et H-6' montrent deux tâches de corrélation :

-La première avec les atomes de carbone à $\delta = 128,7$ et $128,8$ ppm qui ne peuvent être attribués qu'aux carbones C-2' et C-6' des composés 1 et 2 respectivement

- La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 160,9$ ppm qui ne peut être que le C-4'. Ce même atome de carbone montre une tache de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,75$ ppm ($\delta_C = 55,8$ ppm), ceci mène à localiser ce groupement sur le carbone C-4'.

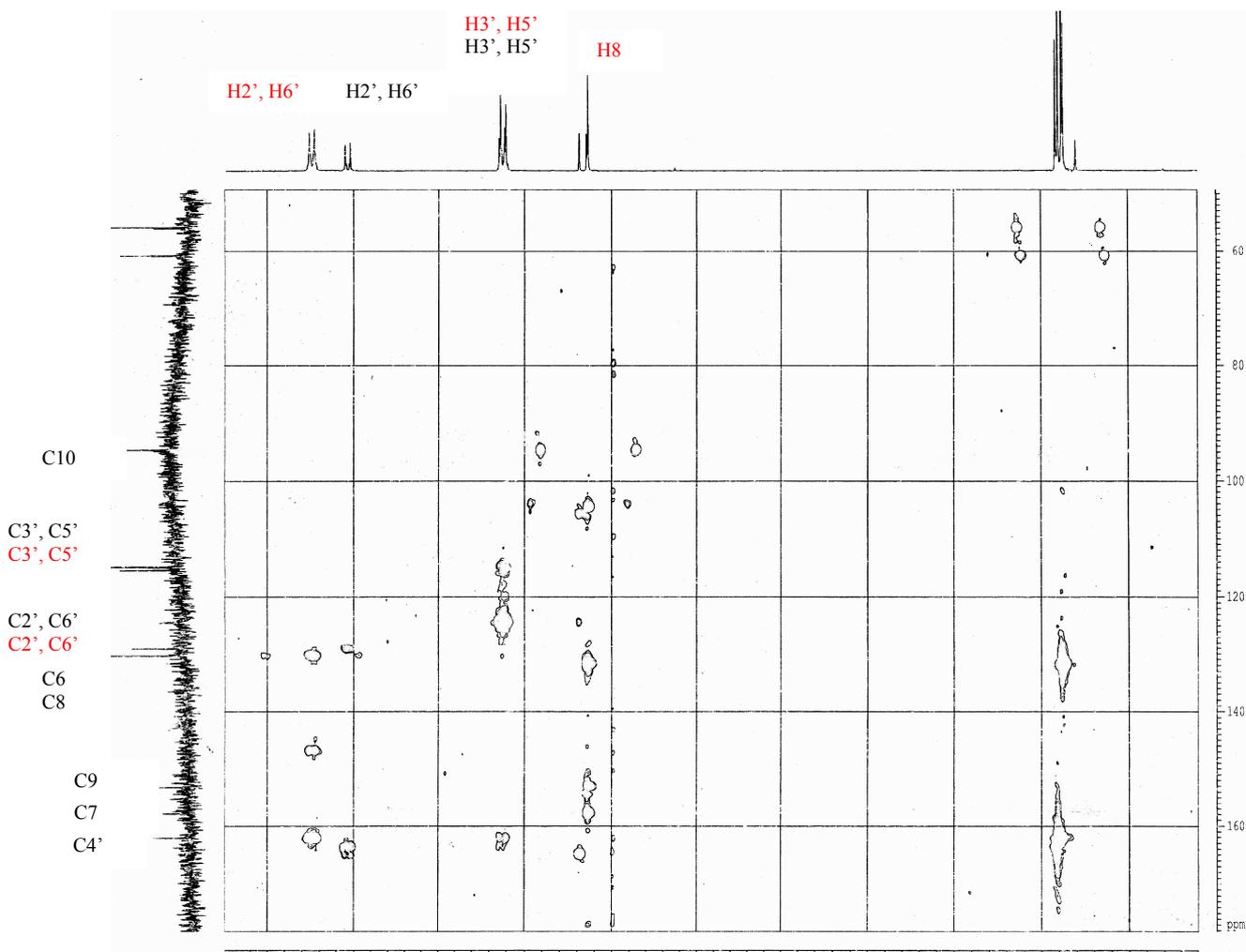


Figure-49 : Spectre HMBC (250MHz, DMSO-d6) du composé F₁₃.

Les spectres UV-visible du composé F₁₃ en présence des différents réactifs ainsi que les spectres EI-MS et RMN de proton nous orientent vers les structures : 5, 7-dihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone (pectolarigenine) et 5, 7, 8-trihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone (pilosin). La structure du composé 2 est encore confirmée par le spectre RMN carbone (Figure-50) qui montre l'absence des signaux entre $\delta = 94$ et 98 ppm caractéristiques des carbones C-8 et C-6 indiquant que ces carbones sont substitués. Ces carbones sont retrouvés à $\delta = 129,7$ et $\delta = 136,7$ ppm respectivement.

Les données relatives au spectre RMN-C¹³ des composés 1 et 2 sont représentées dans les tableaux-49 et 50.

Tableau-49: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé 1.

Carbone	Déplacement chimique
2	163,3
3	103,9
4	182,6
5	152,1
6	131,2
7	157,2
8	94,2
9	151,9
10	104,1
1'	123,7
2'	128,7
3'	114,4
4'	160,9
5'	114,4
6'	128,7
4'-OMe	55,8
6-OMe	60,40

* : le spectre est enregistré dans le DMSO-d₆.

Tableau-50: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé 2.

Carbone	Déplacement chimique
2	162,7
3	102,2
4	182,6
5	146,8
6	136,7
7	153,1
8	129,7
9	151,9
10	103,9
1'	123,7
2'	128,8
3'	115,0
4'	160,9
5'	115,0
6'	128,8
4'-OMe	55,9
6-OMe	60,4

* : le spectre est enregistré dans le DMSO-d₆.

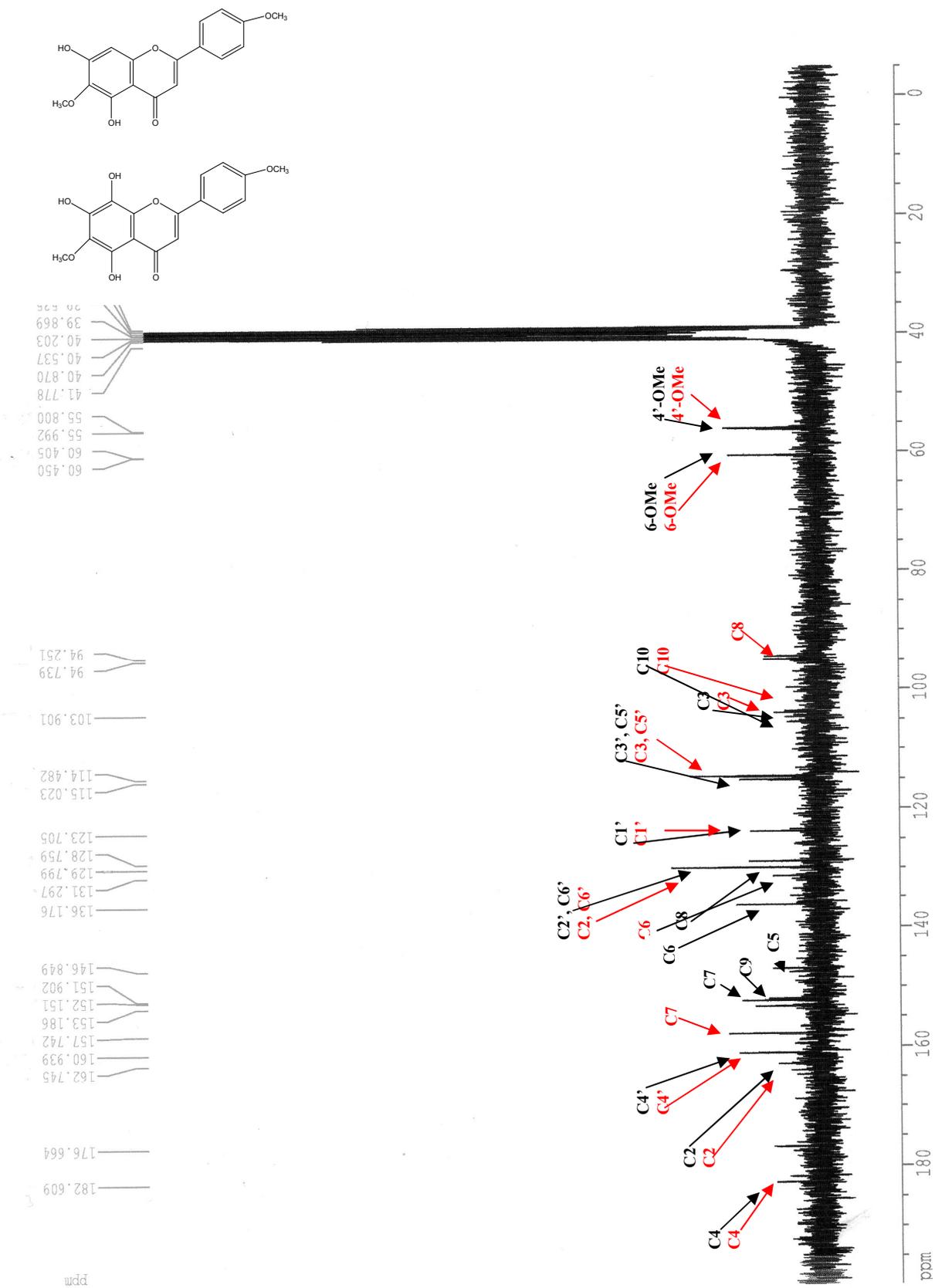


Figure-50 : Spectre RMN-C¹³ (63MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé F₁₃.

L'analyse des différents spectres (UV, EI-MS, RMN- H^1 , RMN- C^{13} , COSY, HSQC et HMBC) du composé F13 ont permis les conclusions suivantes :

-Ce produit est un mélange de deux composés.

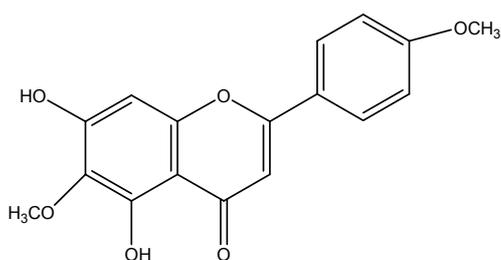
-Les différents spectres présentent des signaux distincts et différents pour les deux produits.

L'analyse de ces signaux nous a permis de proposer comme structure les composés suivants :

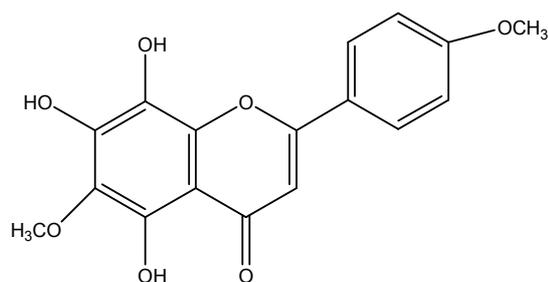
-5, 7-dihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone (pectolarigenine) détectée par GC-MS dans la propolis des régions tropicales (Nagy *et al* 1985, Greenaway *et al* 1987 et 1990).

Nos résultats concernant ce composé sont en accord avec les travaux de Bae Lee *et al* 1994, Hase *et al* 1995, Juang *et al* 2005.

-5, 7, 8-trihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone (pilosin) isolée pour la première fois de la propolis, pour laquelle nos résultats sont en accord avec les travaux de Grayer *et al* 2001.



5, 7-dihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone
(pectolarigenine)



5, 7, 8-trihydroxy-6, 4'-diméthoxyflavone
(pilosin)

V-2-3-2- Elucidation structurale du composé F₁₄ :

La fluorescence violette en UV de ce composé et les valeurs des R_f sur polyamide DC6 dans les systèmes S1 (toluène / méthylethylcétone / méthanol 4 / 3 / 3) et S2 (eau / méthylethylcétone / méthanol / acethylacétone 13 / 3 / 3 / 1) de 0,92 et 0 respectivement sont en faveur d'une structure d'un flavonoïde de type aglycone. Le spectre UV-visible (tableau-52, figure-51) présente deux bandes d'absorption à 258 et 333 nm caractéristiques d'une structure de type flavone.

Le déplacement bathochrome de 49 nm de la bande I dans le spectre enregistré en présence de NaOH par rapport à celui du méthanol, avec diminution de l'intensité est en faveur d'un 4'-OR. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm est en faveur d'un OR en position 7. Cette substitution est confirmée par l'absence de déplacement bathochrome de la bande II du spectre en présence de NaOAc par rapport à celui du spectre méthanol.

Le déplacement bathochrome de 21 nm de la bande I du spectre AlCl₃ + HCl par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5 avec une substitution OR en 6. L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I du spectre AlCl₃ + HCl par rapport à celui enregistré en AlCl₃ indique l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le noyau B. Cette dernière information est confirmée par le déplacement bathochrome de seulement 7 nm de la bande I du spectre enregistré dans le NaOAc+ H₃BO₃ par rapport au spectre méthanolique indiquant la présence d'un système ortho di-OH sur le noyau A. Toutes ces informations nous orientent vers la structure : 5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone. Cette structure sera confirmée par les autres analyses spectrales.

Tableau-51 : Données chromatographiques du composé F₁₄.

Système	S1	S2
R _f	0,92	0
Fluorescence	Violette	

Tableau-52: maximums d'absorption du composé F₁₄ dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	333	258	-
NaOH	382	258	-
NaOAc	362	258	-
NaOAc + H ₃ BO ₃	340	271	-
AlCl ₃	358	278	262
AlCl ₃ + HCl	354	279	260

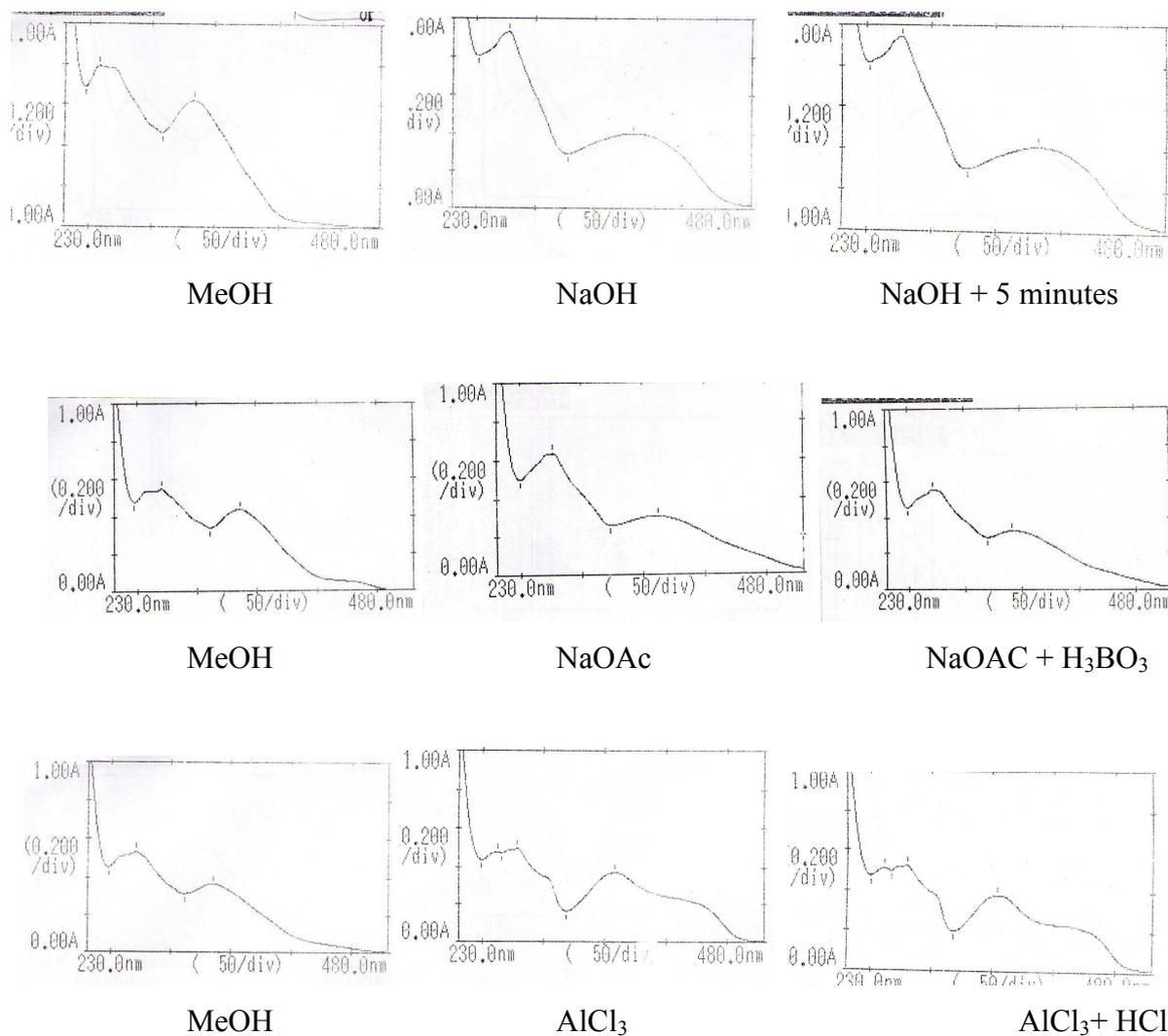


Figure-51: Spectres d'absorption UV-visible du produit F₁₄.

Le spectre de masse en impact électronique EI-MS du composé F₁₄ présente un pic moléculaire [M]⁺ à $m/z = 314$ correspondant à la formule brute C₁₇H₁₄O₆ (figure-52). Ce composé posséderait donc deux groupements hydroxyles et deux autres groupements méthoxyles. Les pics à $m/z = 133$ et $m/z = 132$ correspondent aux fragments [B₁+H]⁺ et [B₁]⁺ respectivement indiquant la présence d'un groupement méthoxyle sur le noyau B. Ce groupement ne peut être qu'on position 4'. Les spectres UV-visible indiquent la présence d'un deuxième groupement méthoxyle en position 7 et de deux groupements hydroxyles qui ne peuvent être qu'on position 5 et 6 respectivement. Cette structure est encore confirmée par la présence d'un pic [A₁-Me]⁺ à $m/z = 167$ correspondant au noyau A après perte d'un groupement méthyle. Les différents fragments du composé F₁₄ sont représentés dans le tableau-53.

Tableau-53: Fragmentation du produit F₁₄

Pics fragments	m/z	%
[M] ⁺	314	100
[M-CH ₃] ⁺	299	86
[M-CH ₃ -CO] ⁺	271	88
[A ₁ -Me] ⁺	167	30
[A ₁ -Me-H ₂ O] ⁺	149	61
[B ₁ +H] ⁺	133	32
[B ₁] ⁺	132	25

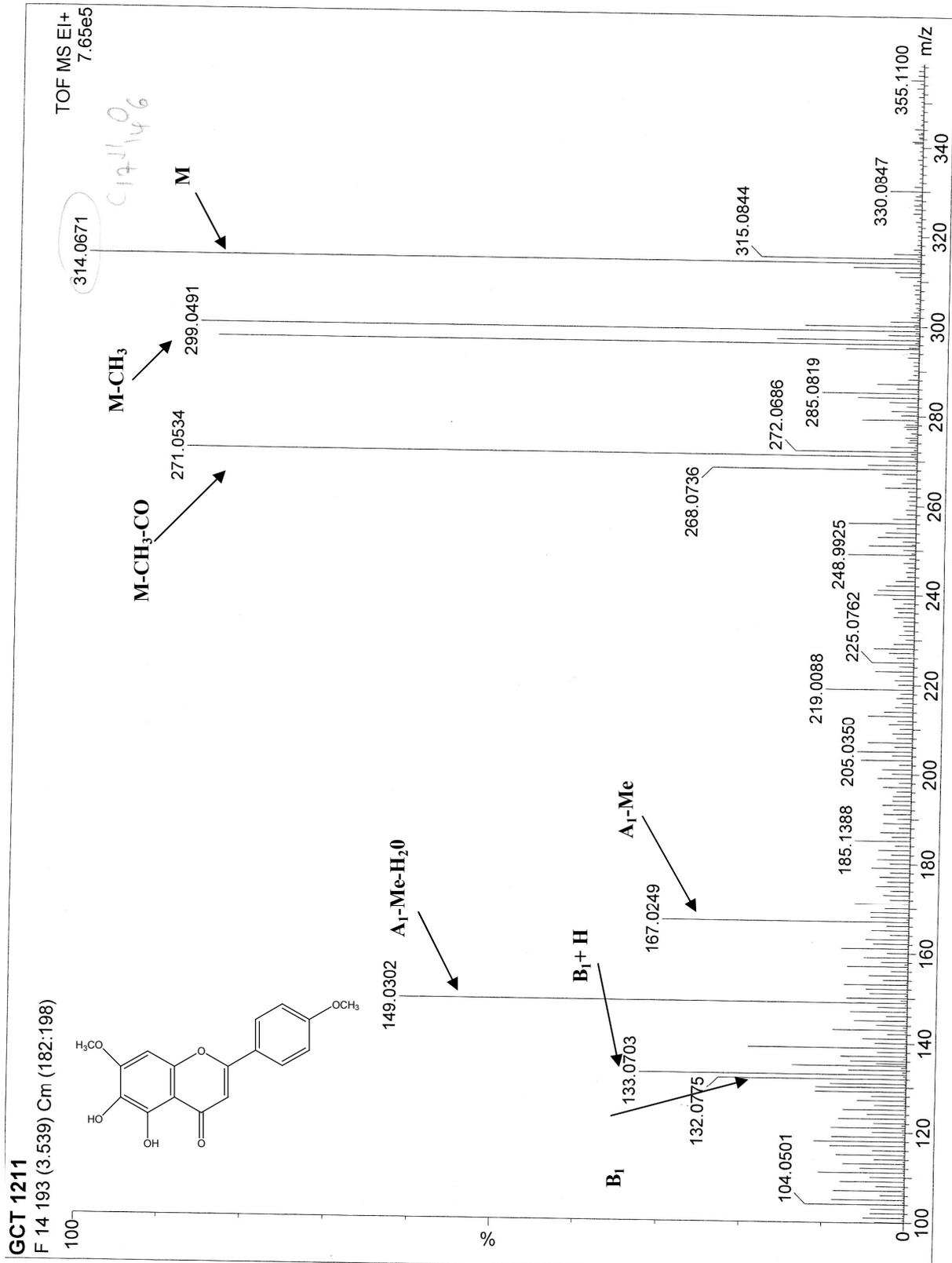


Figure-52 : Spectre EI-MS du produit F₁₄.

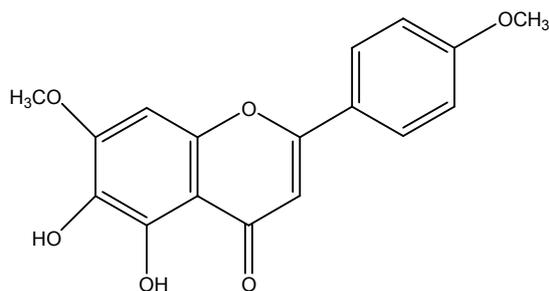
Le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO-*d*₆ à 250 MHz montre la présence de deux singulets d'intégration 3H à 3,9 et 3,8 ppm attribués aux 7-OMe et 4'-OMe respectivement, deux autres singulets d'intégration 1H chacun à 6,9 et 6,8 ppm attribués aux protons H-3 et H-8 respectivement, deux doublets à 8 et 7,1 ppm ($J = 9\text{Hz}$) d'intégration 2H chacun caractéristiques des protons en couplage ortho attribués aux protons H-2', H-6' et H-3', H-5' et un singulet à 12,8 ppm attribué au 5-OH (tableau-54, figure-53 et 54).

Tableau-54: Données RMN- H^1 (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit F₁₄.

δ ppm	Intégration	multiplicité	Constante de couplage	Attribution
3,8	3H	s	-	4'-OMe
3,9	3H	s	-	7-OMe
6,8	1H	s	-	H-8
6,9	1H	s	-	H-3
7,1	2H	d	9	H-3' et H-5'
8	2H	d	9	H-2' et H-6'
12,8	1H	s	-	5-OH

* : le spectre est enregistré dans le DMSO-*d*₆.

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que les spectres RMN du proton et EI-MS du composé F₁₄ nous oriente vers la structure : 5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone (Ladaneine). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Yang *et al* 1996.



5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone (Ladaneine).

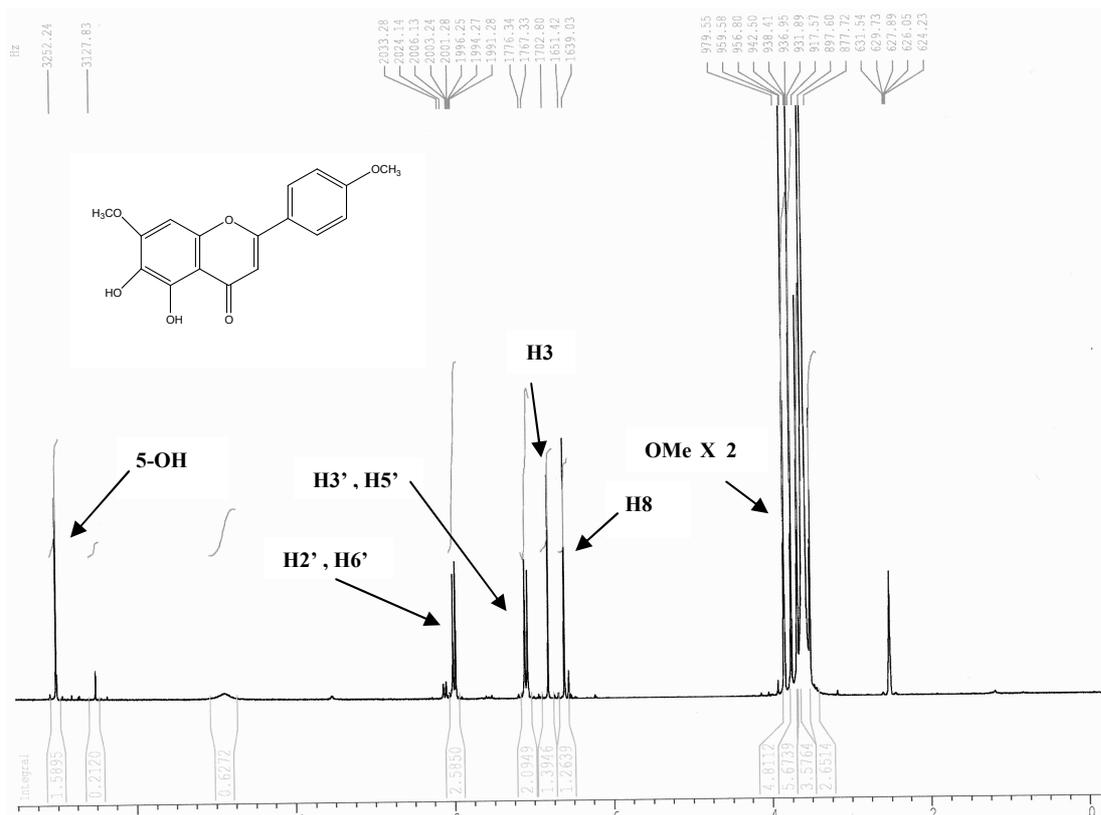


Figure-53: Spectre RMN-H¹ (250MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du produit F₁₄.

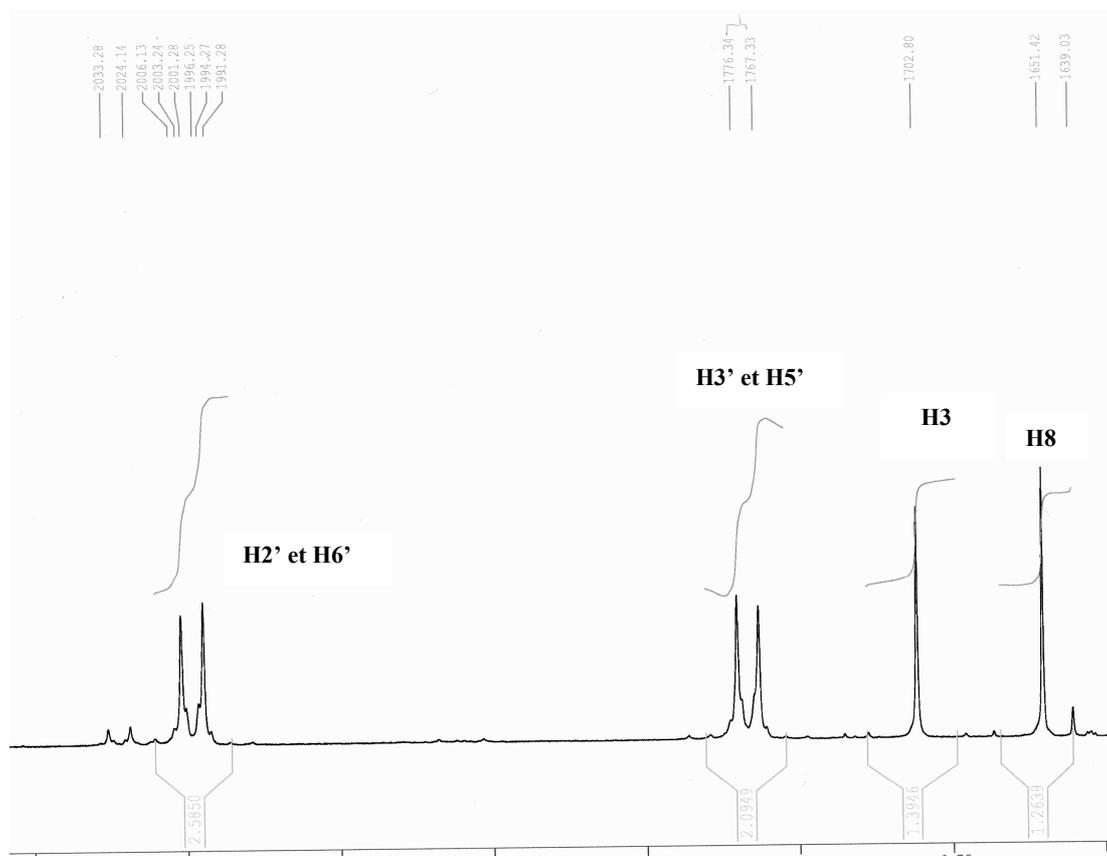


Figure-54 : Etalement du spectre RMN-H¹ du produit F₁₄.

La structure de ce composé est encore confirmée par le spectre RMN-C¹³ (tableau-55, figure-55).

Tableau-55: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit F₁₄.

Carbone	Déplacement chimique
2	163,8
3	103,3
4	182,5
5	151,8
6	131,3
7	157,7
8	94,7
9	152,8
10	104,5
1'	123,1
2'	128,6
3'	114,9
4'	162,7
5'	114,9
6'	128,6
4'-OMe	55,9
7-OMe	60,4

* : spectre enregistré dans le DMSO-d₆.

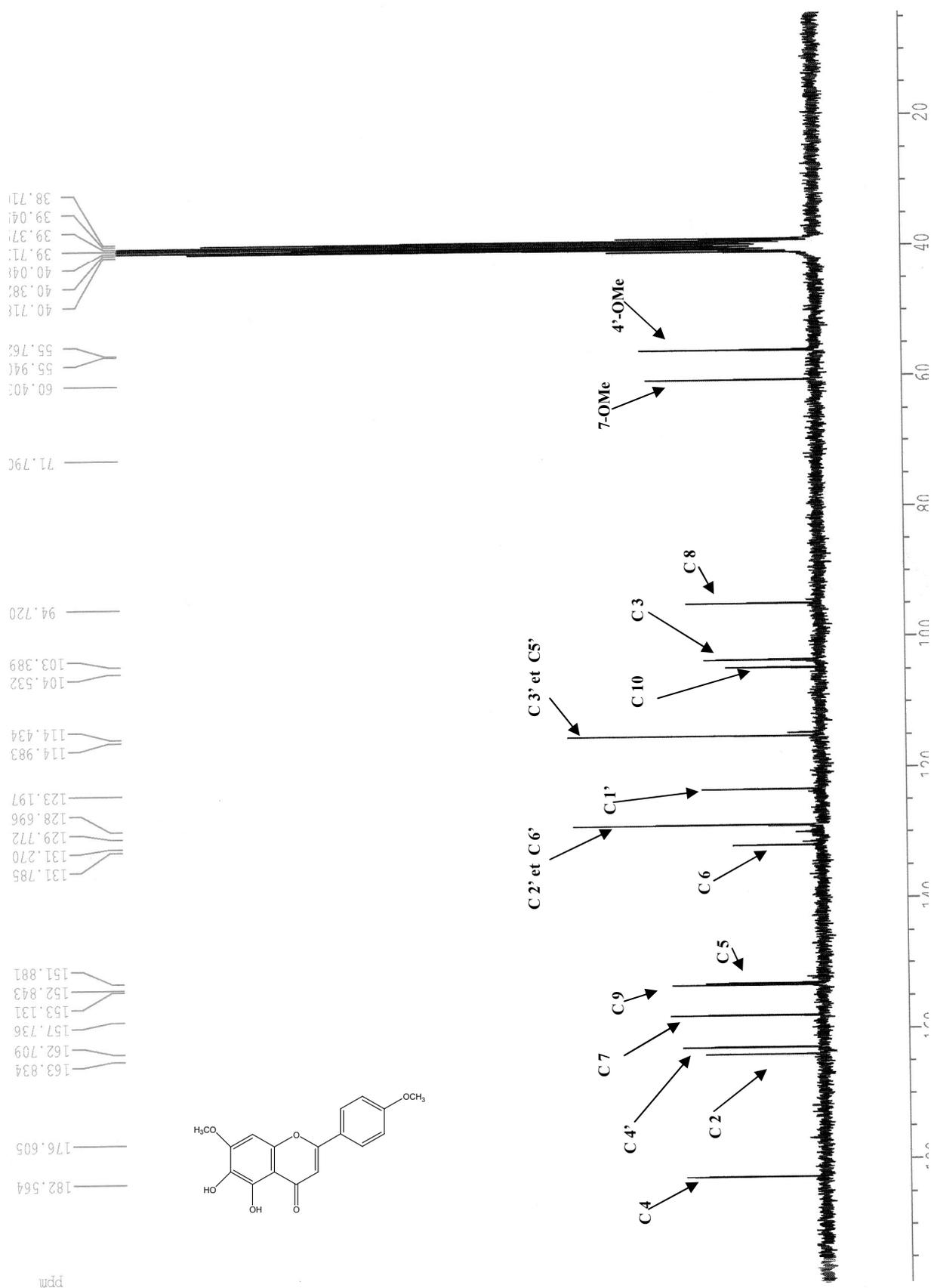


Figure-55 : Spectre RMN-C¹³ (63MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du produit F₁₄

V-2-3-3- Elucidation structurale du composé F₁₅ :

La fluorescence violette en UV de ce composé et les valeurs des R_f sur polyamide DC6 dans les systèmes S1 (toluène / méthylethylcétone / méthanol 4 / 3 / 3) et S2 (eau / méthylethylcétone / méthanol / acethylacétone 13 / 3 / 3 / 1) de 0,91 et 0 respectivement sont en faveur d'une structure de flavonoïde aglycone. Le spectre UV-visible (tableau-57, figure-56) présente deux bandes d'absorption à 269 et 315 nm caractéristiques d'une structure flavone.

L'apparition d'une nouvelle bande à 320 nm dans le spectre enregistré en présence de NaOH indique la présence d'un hydroxyle en position 7. Ceci est confirmé par le déplacement bathochrome de 6 nm de la bande II du spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport au spectre méthanolique.

Le déplacement bathochrome de 53 nm de la bande I du spectre AlCl₃ + HCl par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5. L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I du spectre AlCl₃ + HCl par rapport à celui enregistré en présence d'AlCl₃ indique l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le noyau B. Cette dernière information est confirmée par le faible déplacement bathochrome de la bande I (5 nm) du spectre enregistré dans le NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre méthanolique.

Tableau-56: Données chromatographiques du composé F₁₅.

Système	S1	S2
R _f	0,91	0
Fluorescence	Violette	

S1 : toluène / méthylethylcétone / méthanol 4 / 3 / 3)

S2 : eau / méthylethylcétone / méthanol / acethylacétone 13 / 3 / 3 / 1.

Tableau-57: maximums d'absorption du composé F₁₅ dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	315	269	-
NaOH	387	280	252, 320
NaOAc	354	275	-
NaOAc + H ₃ BO ₃	320	269	-
AlCl ₃	368	277	-
AlCl ₃ + HCl	368	277	-

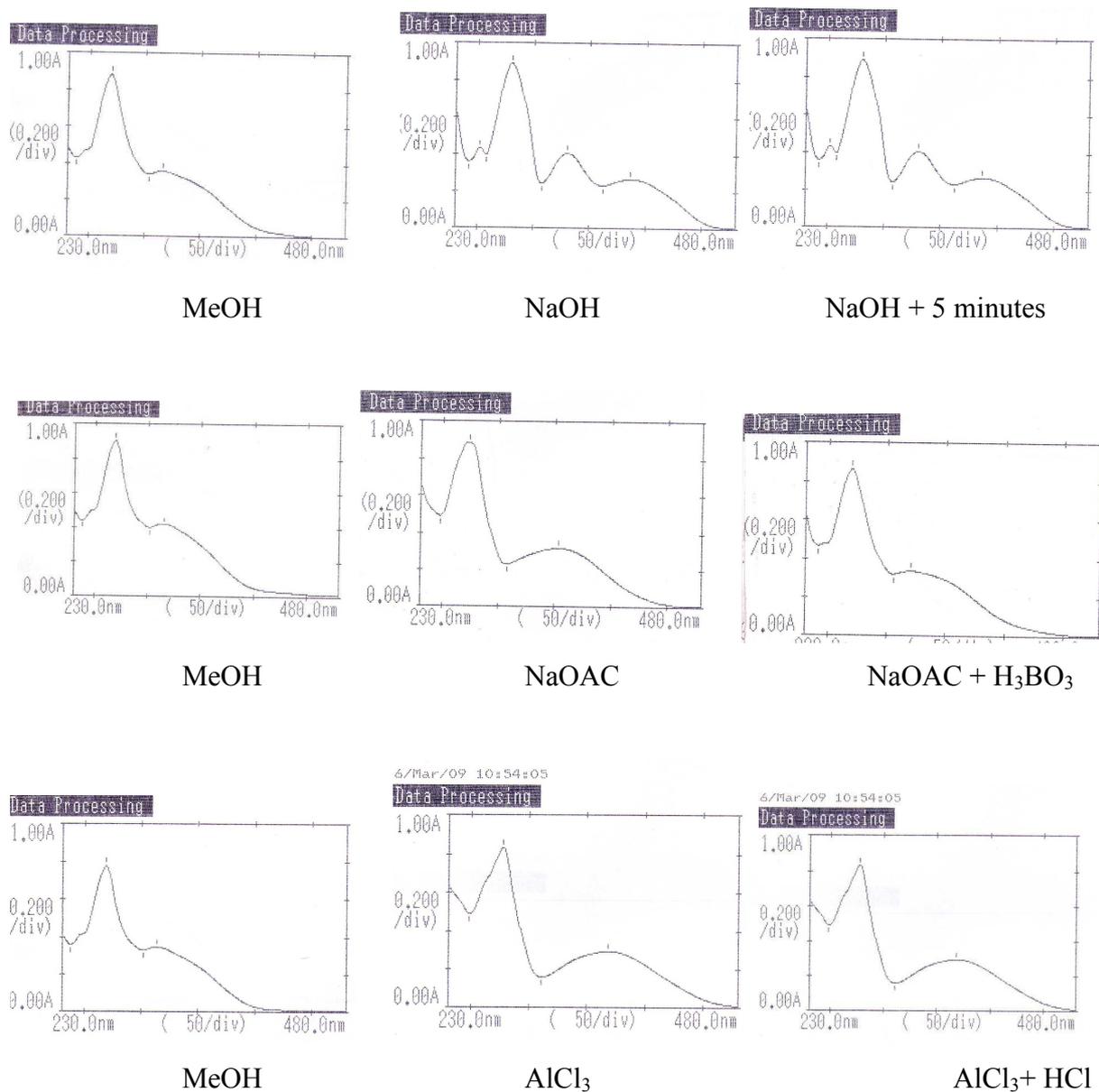


Figure-56 : Spectres d'absorption UV-visible du produit F₁₅.

Le spectre de masse en impact électronique EI-MS a donné un pic $[M]^+$ à $m/z = 254$ ce qui correspond à la formule brute $C_{15}H_{10}O_4$. Ce composé posséderait donc deux groupements hydroxyles. Le pic à $m/z = 152$ correspond donc au fragment $[A_1]^+$ avec deux groupements hydroxyles qui ne peuvent être qu'on position 5 et 7. Le pic à $m/z = 102$ correspond donc au fragment $[B_1]^+$. Ce fragment ne possède aucun substituant. Ces résultats nous orientent vers la structure: 5,7-dihydroxyflavone (Chryisine). Les différents fragments du composé F_{15} sont représentés dans le tableau-58.

Tableau-58: Fragmentation du produit F_{15}

Pics fragments	m/z	%
$[M]^+$	254	100
$[M-CO]^+$	226	21
$[A_1]^+$	152	15
$[A_1-CO]^+$	124	10
$[B_1]^+$	102	17

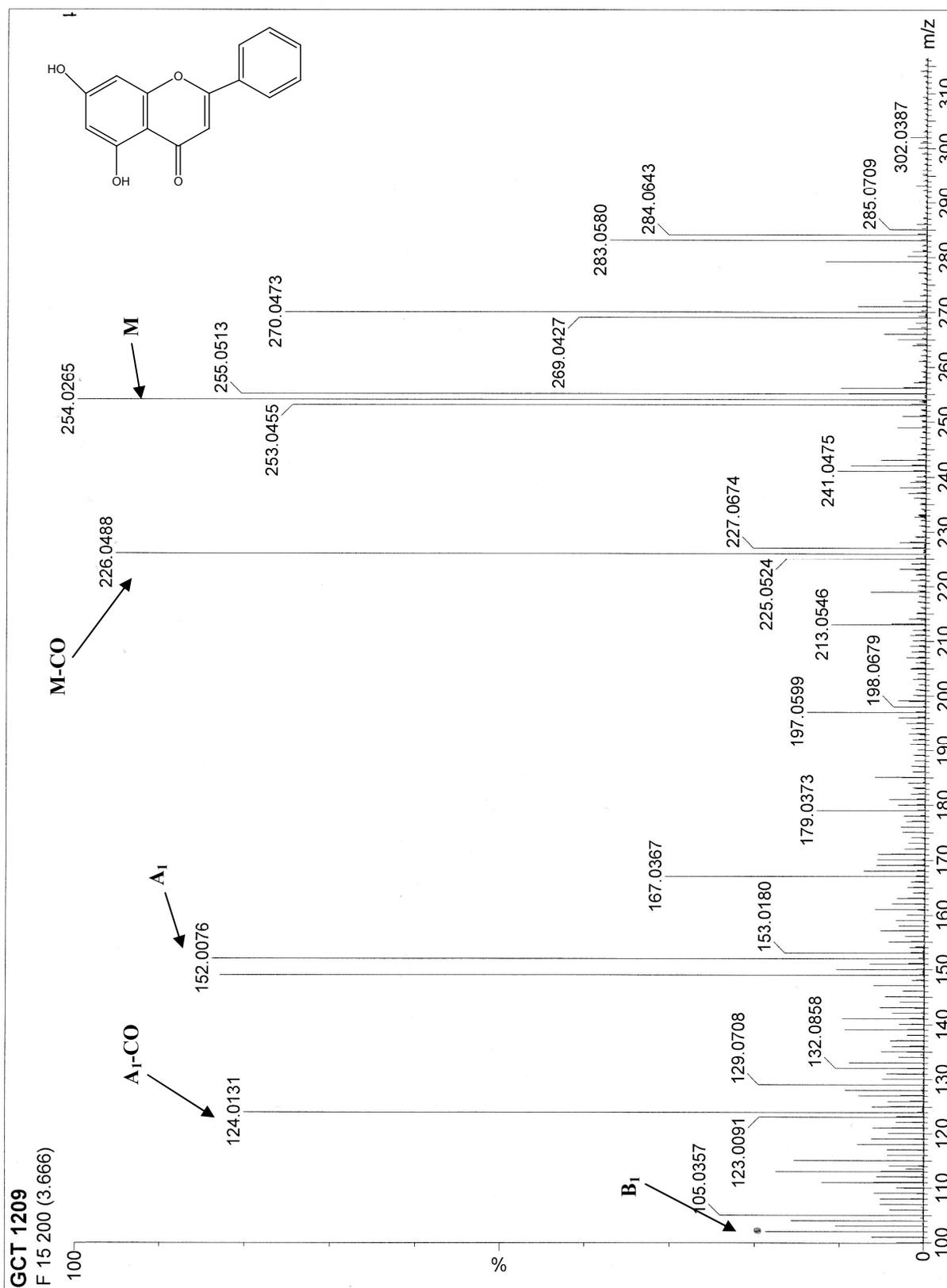


Figure-57 : Spectre EI-MS du produit F₁₅.

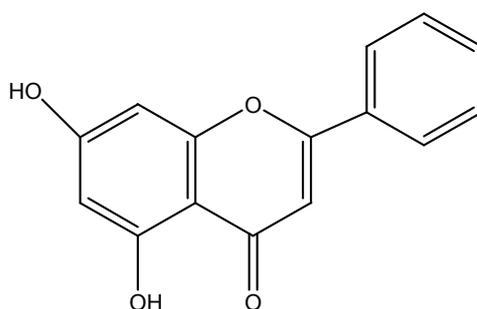
Le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO-*d*₆ à 250 MHz montre la présence de deux doublets d'intégration 1H chacun à 6,5 et 6,2 ppm ($J = 2$ Hz) caractéristiques des protons en couplage métha attribués aux protons H-8 et H-6 respectivement. Le singulet d'intégration 1H à 6,9 ppm est attribué à H-3. Le spectre présente aussi un multiplet d'intégration 3H à 7,5 ppm et un doublet dédoublé d'intégration 2H à 8 ppm ($J = 7,6$ et $1,6$ Hz) correspondants à un total de cinq protons sur le noyau B, confirmant l'absence de substituant sur ce noyau. Le multiplet à 7,5 ppm est attribué aux protons H-3', H-4' et H-5'. Le doublet dédoublé à 8 ppm est attribué aux protons H-2' et H-6'. Le singulet à 12,8 ppm est attribué au OH en position 5 (tableau-59, figure-58 et 59).

Tableau-59 : Données RMN-¹H (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit F₁₅.

δ ppm	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage	Attribution
6,2	1H	d	2	H-6
6,5	1H	d	2	H-8
6,9	1H	s	-	H-3
7,5	3H	m	-	H-3', H-4' et H-5'
8	2H	dd	7,6 et 1,6	H-2' et H-6'
12,8	1H	s	-	5-OH

* : spectre enregistré dans le DMSO-*d*₆.

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que les spectres RMN du proton et EI-MS du composé F₁₅ nous oriente vers la structure : 5,7-dihydroxyflavone (chrysin). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Yang *et al* 1996, Chen *et al* 2003 et McNab *et al* 2009.



5,7-dihydroxyflavone (chrysin).

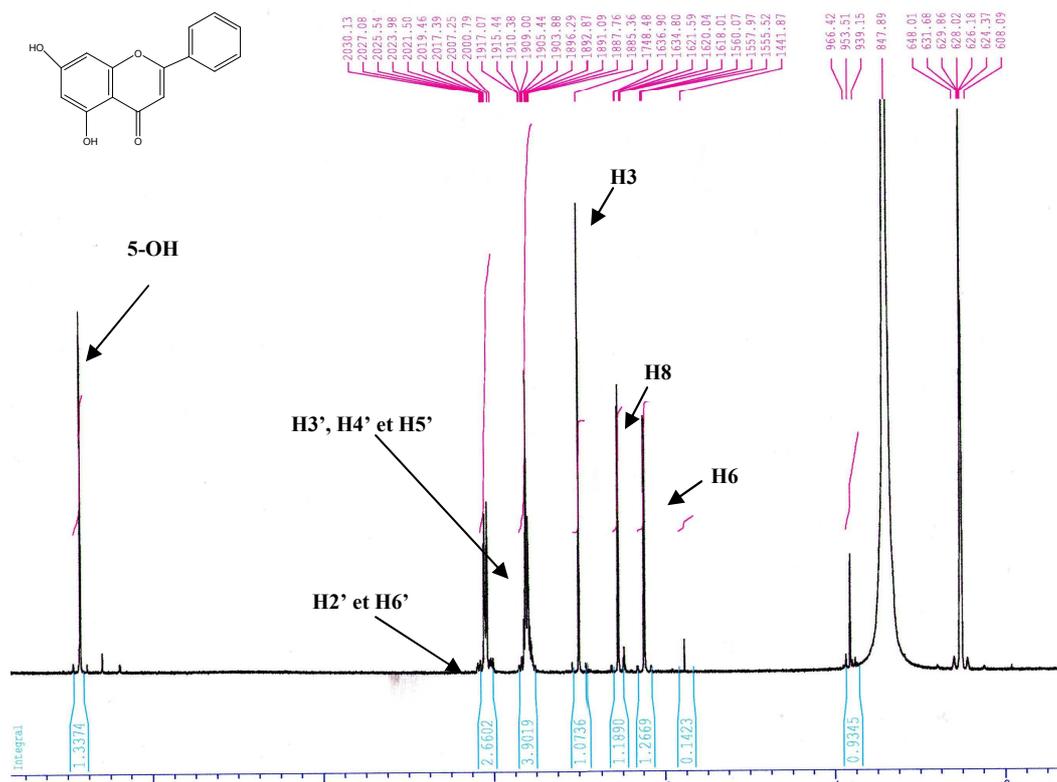


Figure-58 : Spectre RMN-H¹ (250MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du produit F₁₅.

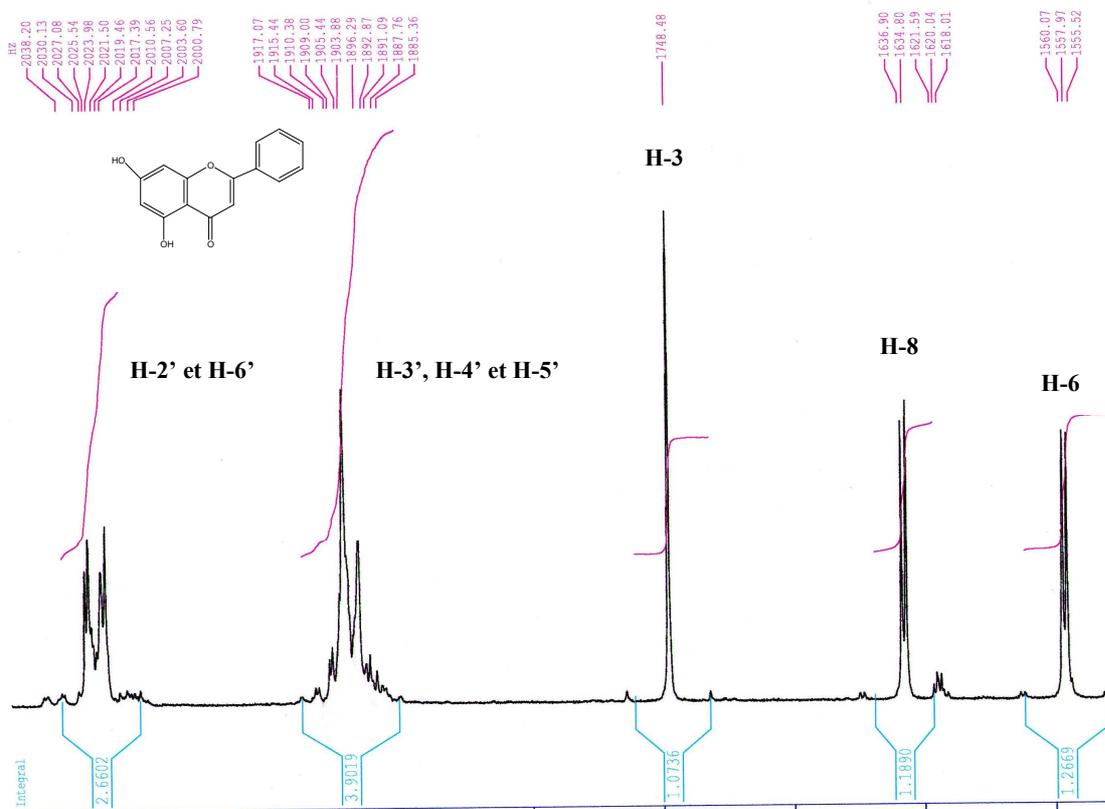


Figure-59 : Etalement du spectre RMN-H¹ du produit F₁₅

La structure de ce composé est encore confirmée par le spectre RMN-C¹³ (tableau-60, figure-60).

Tableau-60: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit F₁₅.

Carbone	Déplacement chimique
2	162,6
3	104,3
4	182,3
5	161,8
6	99,5
7	164,9
8	94,7
9	157,5
10	105,10
1'	131,1
2'	126,8
3'	129,5
4'	132,4
5'	129,5
6'	126,8

* : spectre enregistré dans le DMSO-d₆.

V-2-3-4- Elucidation structurale du composé F₁₉₋₂₄:

Ce composé n'absorbe pas sous la lumière UV. La coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique montre que ce composé peut être un stéroïde ou un composé des huiles essentielles.

Le spectre infrarouge (figure-61) montre une large bande entre 2500 et 3000 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation OH d'un acide carboxylique. Les deux bandes à 2854,5 et 2923,9 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons (C-H) hybridées sp^3 . Ces bandes sont intenses ce qui indique un caractère aliphatique de notre composé. La bande intense vers 1708 cm^{-1} correspond aux vibrations des liaisons carbonyles (C=O). Tandis que la bande d'intensité plus faible vers 1461 cm^{-1} correspond aux vibrations des doubles liaisons carbone-carbone (C=C). Ces signaux sont typiques des acides gras.

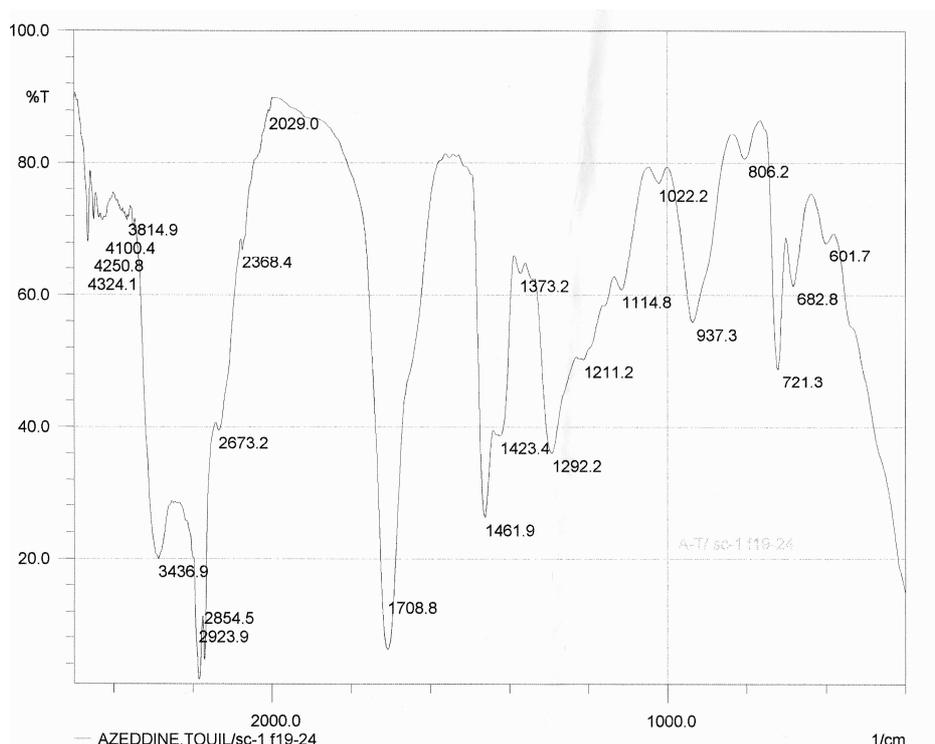


Figure-61 : Spectre infrarouge du produit F₁₉₋₂₄.

- Le spectre RMN- H^1 (figure-62, 63 et 64) du composé F_{19-24} permet d'observer :
- un triplet à $\delta = 0,88$ ppm correspondant à un CH_3 couplé à deux protons équivalents (CH_2).
 - Le multiplet à $\delta = 1,25$ ppm dont la surface du pic est très importante montre qu'on a plusieurs CH_2 ayant un environnement très proche.
 - Le triplet à $\delta = 2,36$ ppm est caractéristique d'un CH_2 directement lié à une fonction carbonyle ($-COOH$).
 - le multiplet à $\delta = 5,34$ ppm est caractéristique des protons portés par des carbones engagés dans une double liaison. La faible constante de couplage montre que les protons sont en position cis l'un par rapport à l'autre.

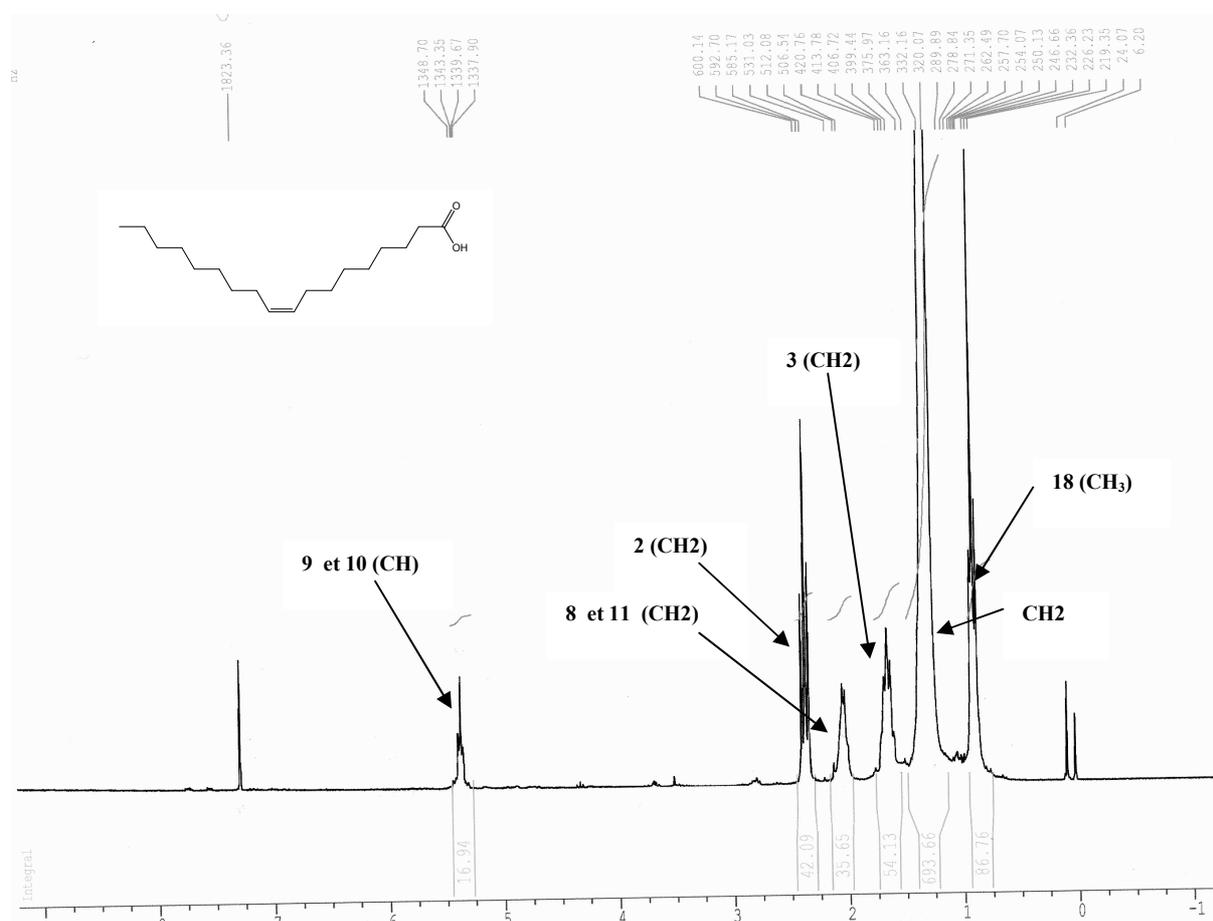


Figure-62 : Spectre RMN- H^1 (250MHz, $CDCl_3$, δ ppm) du produit F_{19-24}

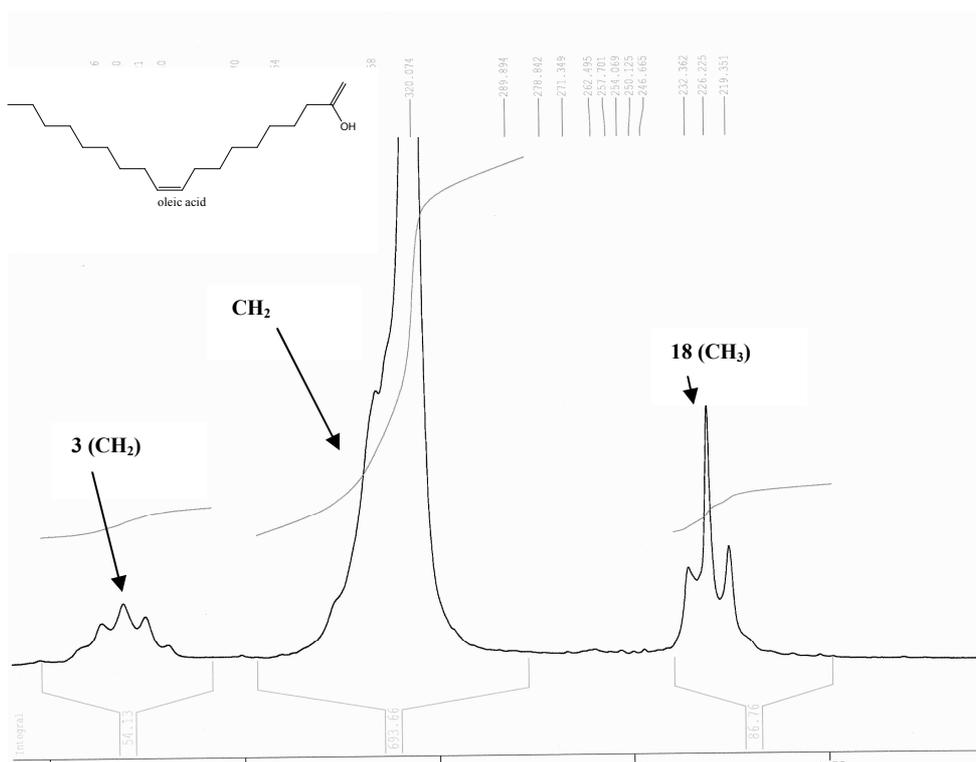


Figure-63 : Etalement du spectre RMN-H¹ du produit F₁₉₋₂₄

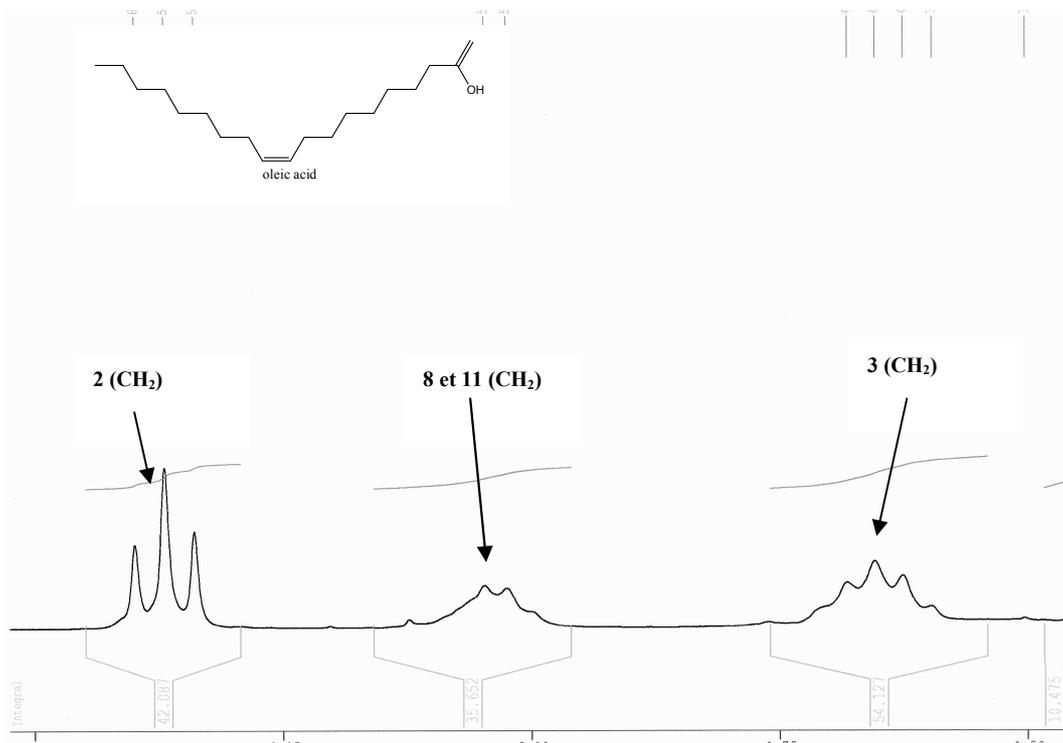


Figure-64: Etalement du spectre RMN-H¹ du produit F₁₉₋₂₄.

- Le spectre RMN-C¹³ (figure-65) du composé F₁₉₋₂₄ montre la présence :
- d'un signal à $\delta = 180,0$ ppm attribuable au carbone porteur de la fonction acide (-COOH).
 - d'un signal à $\delta = 130,1$ ppm attribuable aux carbones éthyléniques (C=C).
 - Le signal intense à $\delta = 31,8$ ppm correspond à plusieurs carbones aliphatiques ayant des environnements semblables (-CH₂).
 - Les signaux à δ inférieur à 31,8 ppm ont un caractère plus aliphatique que les groupements (-CH₂) précédents. Alors que les signaux à δ légèrement supérieur à 31,8 ppm sont caractéristiques des protons à caractère moins aliphatique que les premiers groupements méthylènes (-CH₂). Ce qui montre que ces carbones sont proches de la fonction carboxylique.
 - Le signal à $\delta = 14,0$ ppm correspond au carbone du groupement méthyle. L'ensemble de ces observations laissent supposer que le composé F₁₉₋₂₄ est un acide gras insaturé.

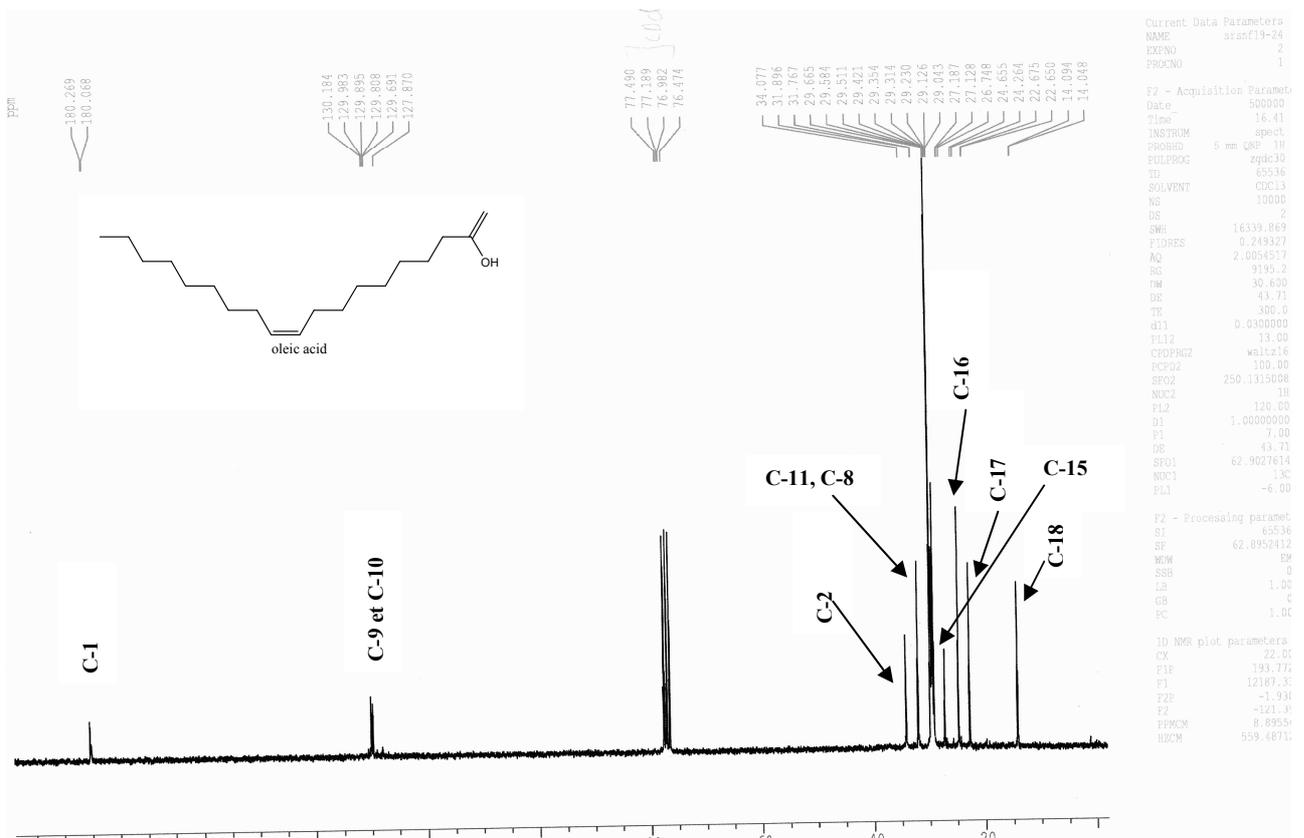


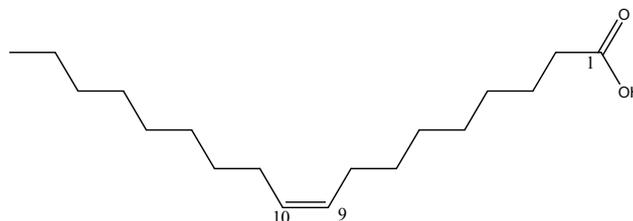
Figure-65 : Spectre RMN-C¹³ (63MHz, CDCl₃, δ ppm) du produit F₁₉₋₂₄

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé F₁₉₋₂₄ sont représentées dans le tableau-61.

Tableau-61 : Déplacements chimiques des protons et des carbones du composé F₁₉₋₂₄.

Numéro de carbone	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1C	-	180,0
2 (CH ₂)	2,36 t	34,0
3 (CH ₂)	1,55 m	24,6
4 (CH ₂)	1,25 m	29,0
5 (CH ₂)	1,25 m	29,0
6 (CH ₂)	1,25 m	29,0
7 (CH ₂)	1,25 m	29,0
8 (CH ₂)	2,02 m	27,1
9 (CH)	5,34 m	130,1
10 (CH)	5,34 m	130,1
11 (CH ₂)	2,02 m	27,1
12 (CH ₂)	1,25 m	29,0
13 (CH ₂)	1,25 m	29,0
14 (CH ₂)	1,25 m	29,0
15 (CH ₂)	1,25 m	29,0
16 (CH ₂)	1,25 m	31,8
17 (CH ₂)	1,25 m	22,6
18 (CH ₃)	0,88 t	14,0

L'analyse des spectres infrarouge et RMN proton et carbone du composé F₁₉₋₂₄ ainsi que leur comparaison avec ceux de [Pinheiro et al 2009](#) et [Won et al 2007](#) nous permettent d'attribuer la structure : acide (9Z) octadec-9-énoïque (acide oleique) correspondant à la formule C₁₈H₃₄O₂ au composé F₁₉₋₂₄.



Acide (9Z) octadec-9-énoïque (acide oleique)

V-2-3-5- Elucidation structurale du composé C-f55-57:

Ce composé n'absorbe pas sous la lumière UV (254 et 365 nm). La coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique montre que ce composé peut être un stéroïde ou un composé des huiles essentielles.

Le spectre infrarouge (figure-66) de ce composé présente des signaux semblables à ceux du composé F₁₉₋₂₄. Ces signaux sont typiques des acides gras. Nous remarquons la présence d'une large bande entre 2500 et 3000 cm⁻¹ correspondante à la vibration d'élongation OH d'un acide carboxylique. Les deux bandes à 2850,6 et 2920 cm⁻¹ sont attribuables aux vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons (C-H) hybridées sp³. Ces bandes sont intenses ce qui indique un caractère aliphatique de notre composé. La bande intense vers 1701,1 cm⁻¹ correspond aux vibrations des liaisons carbonyles (C=O). Tandis que les bandes d'intensité plus faible vers 1465,8 et 1427,2 cm⁻¹ correspondent aux vibrations des doubles liaisons carbone-carbone (C=C).

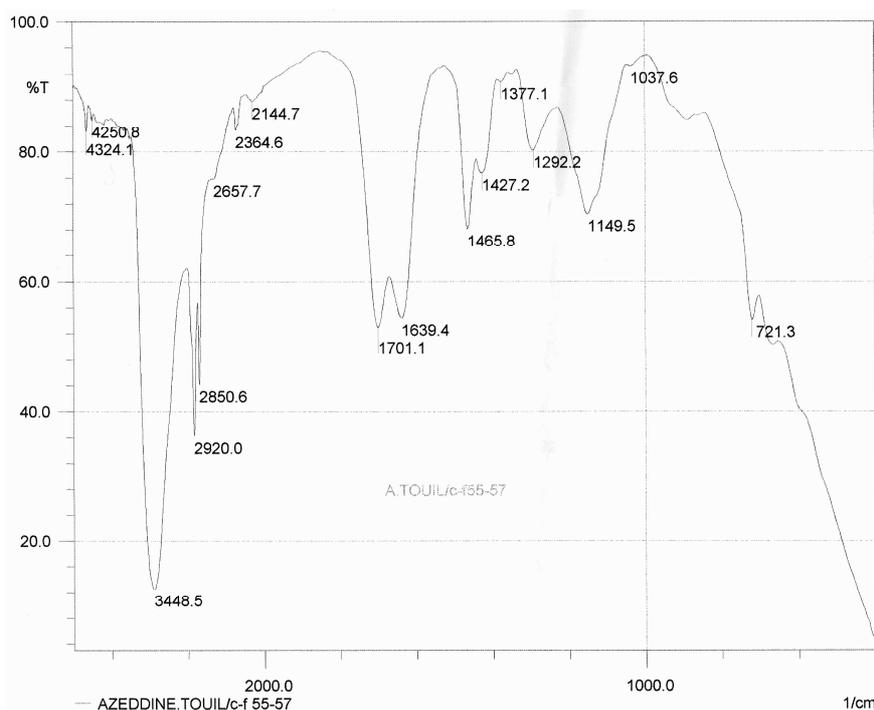


Figure-66 : Spectre infrarouge du composé C-f55-57

Le spectre EI-MS de ce composé présente un pic [M]⁺ à $m/z = 280$ correspondant à la formule brute relative C₁₈H₃₂O₂ (figure-67).

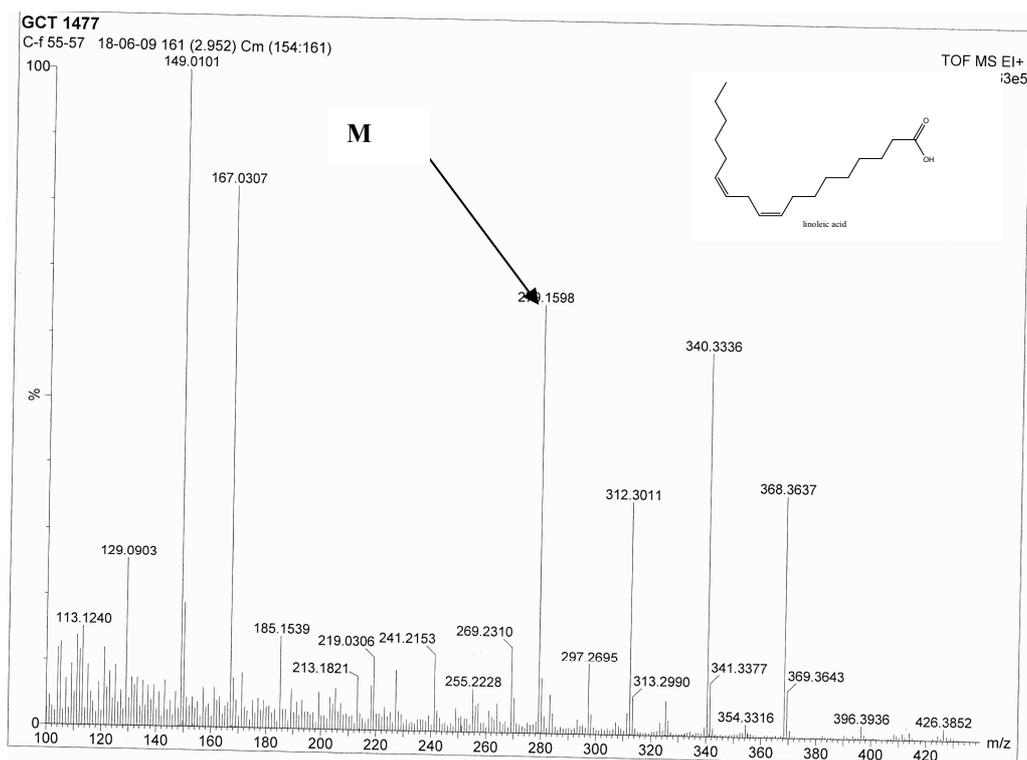


Figure-67 : Spectre de masse du composé C-f55-57

Le spectre RMN- ^1H (figure-68) de ce composé ressemble à celui du composé F₁₉₋₂₄. Nous remarquons la présence des signaux suivants :

- un triplet à $\delta = 0,88$ ppm correspondant à un CH_3 couplé à deux protons équivalents (CH_2).
- Les multiplets à $\delta = 1,3$ et $1,65$ ppm dont la surface des pics est très importante montrent qu'on a plusieurs CH_2 ayant un environnement très proche.
- Le triplet à $\delta = 2,23$ ppm est caractéristique d'un CH_2 directement lié à une fonction acide ($-\text{COOH}$).
- le multiplet à $\delta = 5,43$ ppm est caractéristique des protons portés par des carbones engagés dans une double liaison. La faible constante de couplage montre que les protons sont en position cis l'un par rapport à l'autre.

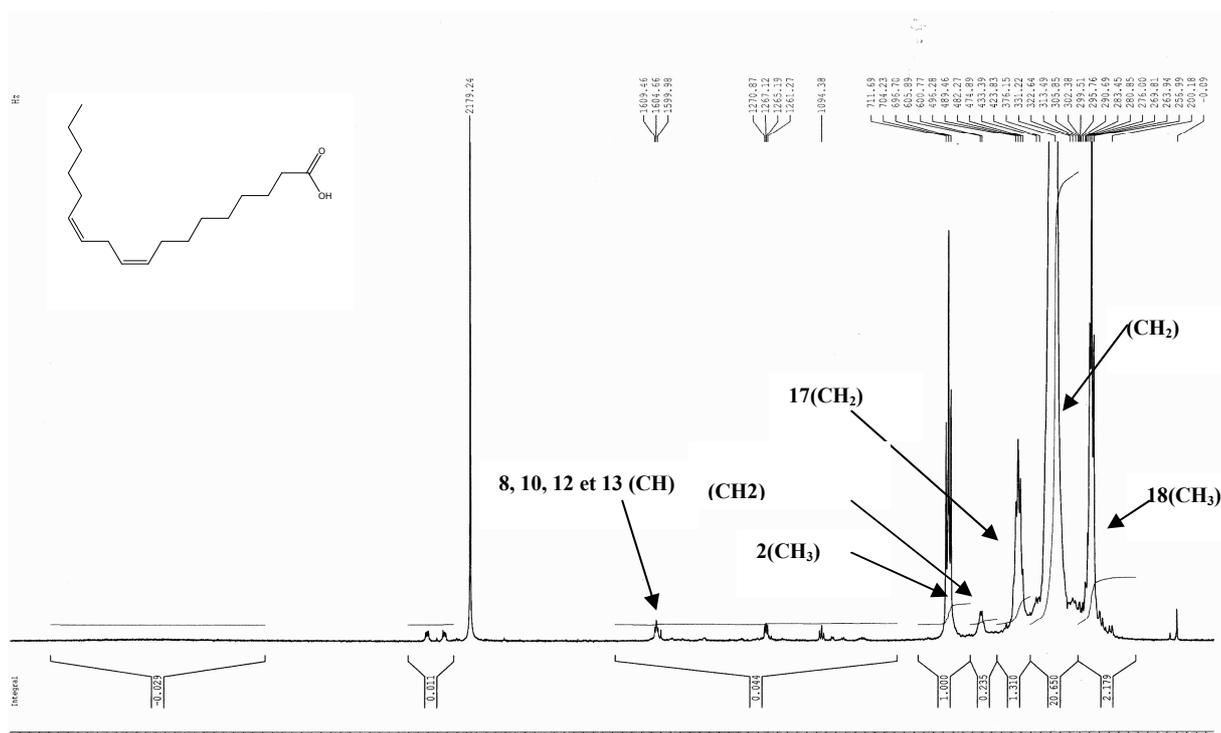


Figure-68 : Spectre RMN-H¹ (250MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé C-f55-57.

Le spectre RMN-C¹³ (figure-69) du composé C-f55-57 permet d'observer :

- un signal à $\delta = 179,5$ ppm attribué au carbone porteur de la fonction carbonyle (-COOH).
- plusieurs signaux entre $\delta = 130,8$ ppm et $\delta = 129,8$ ppm attribuables aux carbones de la double liaison (C=C). Ces signaux correspondent aux carbones oléfiniques 9, 10, 12 et 13.
- des signaux entre 22,6 et 33,9 ppm caractéristiques des CH₂.
- un signal résonant à champ fort à $\delta = 14,1$ ppm attribué au carbone du groupement méthyle (-CH₃).

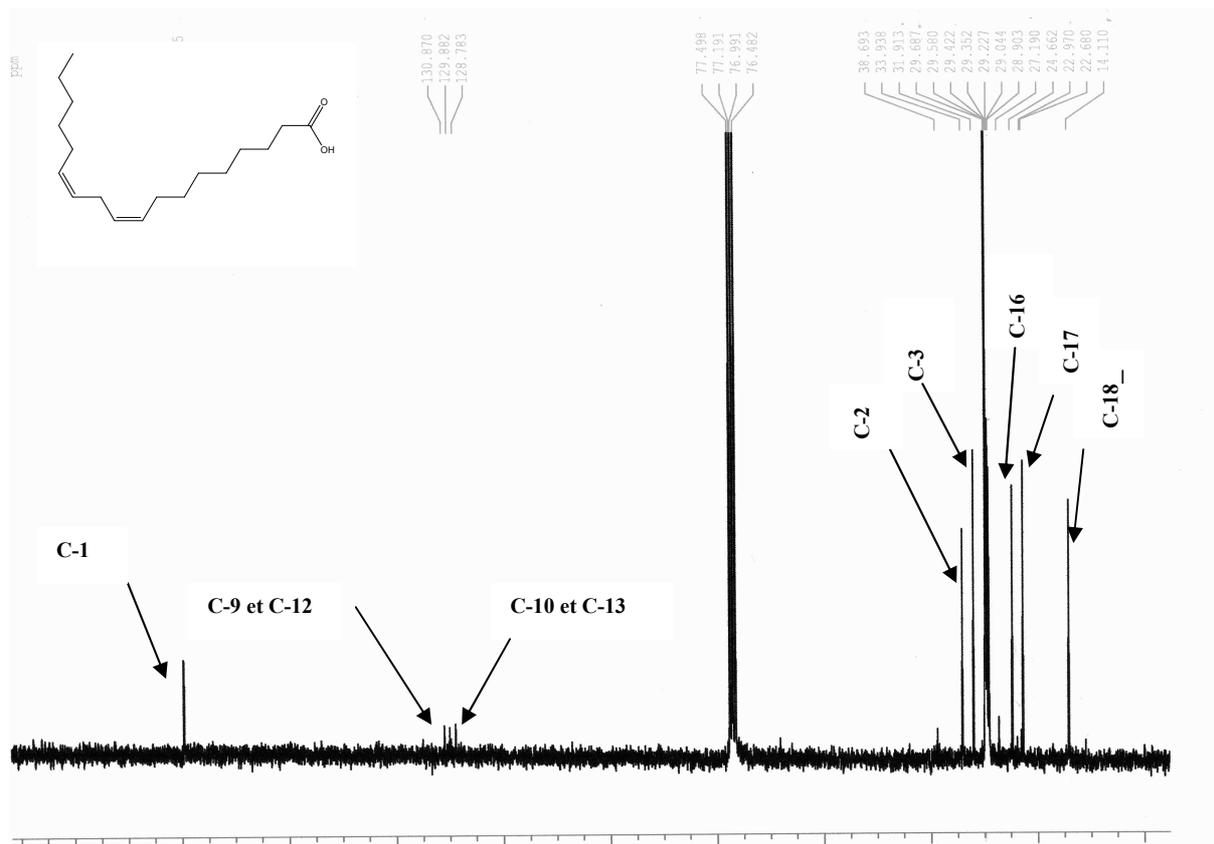


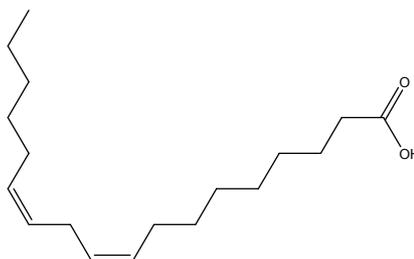
Figure-69 : Spectre RMN- C^{13} (63MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé C-f55-57.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé C-f55-57 sont représentées dans le tableau-62.

Tableau-62: Déplacements chimiques des protons et des carbones du composé C-f55-57.

Numéro de carbone	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1C	-	179,5
2 (CH ₂)	2,23 t	38,6
3 (CH ₂)	1,65 m	24,6
4 (CH ₂)	1,3 m	29,0
5 (CH ₂)	1,3 m	29,4
6 (CH ₂)	1,3 m	29,5
7 (CH ₂)	1,3 m	29,6
8 (CH ₂)	2,02 m	27,1
9 (CH)	5,34 m	130,8
10 (CH)	5,34 m	129,8
11 (CH ₂)	2,02 m	24,6
12 (CH)	5,34 m	129,8
13 (CH)	5,34 m	130,8
14 (CH ₂)	2,02 m	27,1
15 (CH ₂)	1,3 m	29,5
16 (CH ₂)	1,3 m	31,9
17 (CH ₂)	1,3 m	22,9
18 (CH ₃)	0,88 t	14,1

L'analyse des spectres infrarouge, EI-MS et RMN proton et carbone du composé C-f55-59 ainsi que leur comparaison avec les travaux de *Won et al 2007* nous permet d'attribuer la structure : acide cis, cis-9, 12 octadecadiénoïque (acide linoléique) correspondant à la formule C₁₈H₃₂O₂.



Acide cis, cis-9, 12 octadecadiénoïque (acide linoléique).

V-2-3-6- Elucidation structurale du composé C-f65:

Ce composé n'absorbe pas sous la lumière UV (254 et 365 nm), sa couleur après révélation à la vanilline sulfurique est violette. Le spectre infrarouge (figure-70) de ce composé présente des signaux semblables à ceux du composé C-f55-57. Ces signaux sont typiques des acides gras. Nous remarquons la présence de :

- Une large bande entre 2500 et 3000 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation OH d'un acide.
- deux bandes à 2850,6 et 2920 cm^{-1} caractéristiques des vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons (C-H) hybridées sp^3 . Ces bandes sont intenses ce qui indique un caractère aliphatique de ce composé.
- une bande d'intensité faible vers 1465,8 cm^{-1} correspondant aux vibrations des doubles liaisons carbone-carbone (C=C)
- Une bande à 1149 cm^{-1} caractéristique de la liaison simple carbone-oxygène d'une fonction acide (groupement carbonyle).

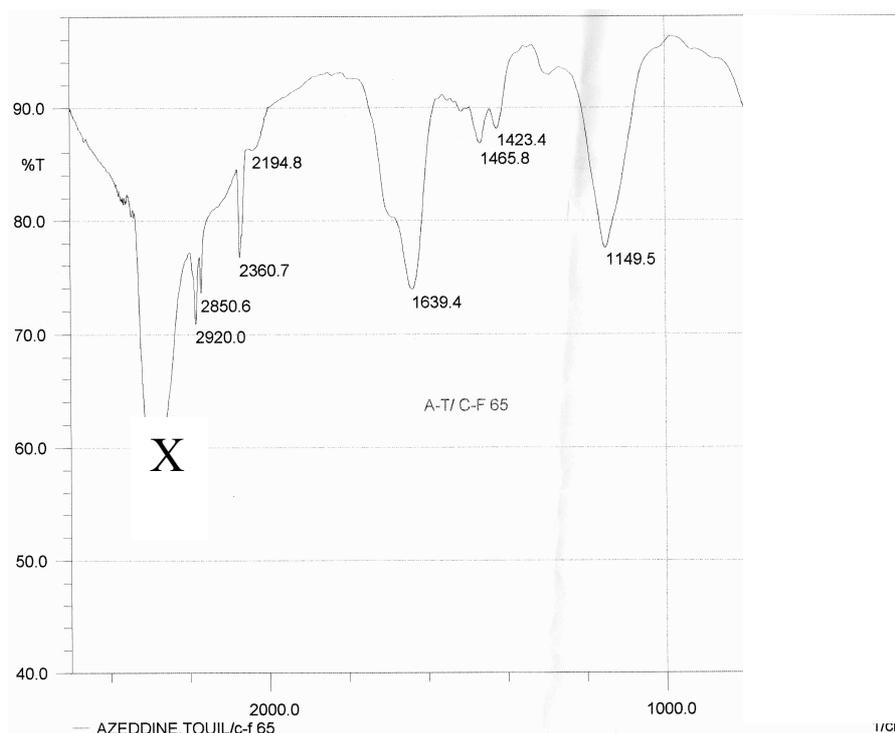


Figure-70 : Spectre infrarouge du composé C-f65.

Le spectre EI-MS de ce composé enregistré en mode positif montre un pic $[\text{M}]^+$ à $m/z = 312$ soit une masse moléculaire égale à $M = 312$ correspondant à une formule brute relative $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ (Figure-71).

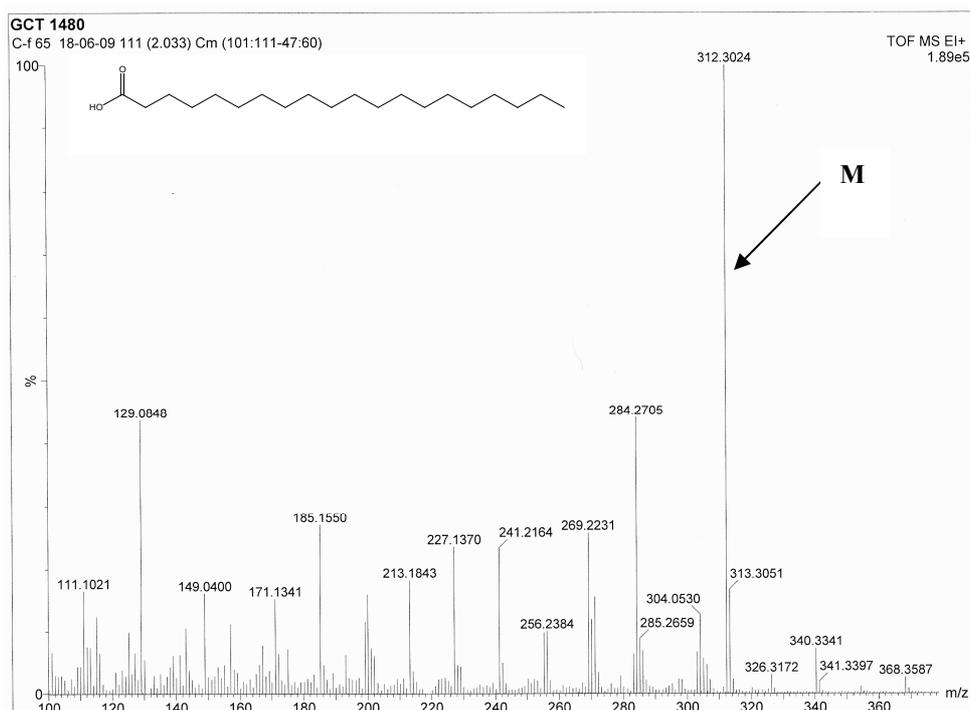


Figure-71 ; Spectre EI-MS du composé C-f65.

Les spectres RMN- H^1 et RMN- C^{13} de ce composé sont très proches de ceux des composés F₁₉₋₂₄ et C-f55-57 à l'exception des différences suivantes :

-l'absence du multiplet à 2,02 ppm.

-l'absence des signaux entre 129 et 130 ppm sur le spectre RMN- C^{13} . Ce composé serait donc un acide gras saturé.

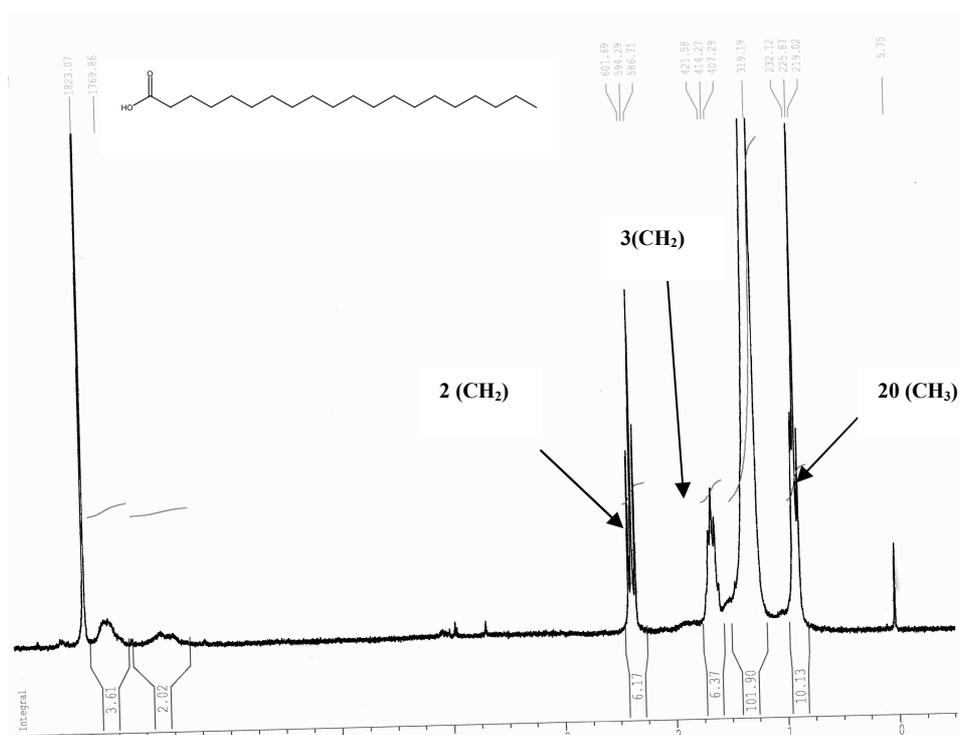


Figure-72 : Spectre RMN- H^1 (250MHz, $CDCl_3$, δ ppm) du composé C-f65.

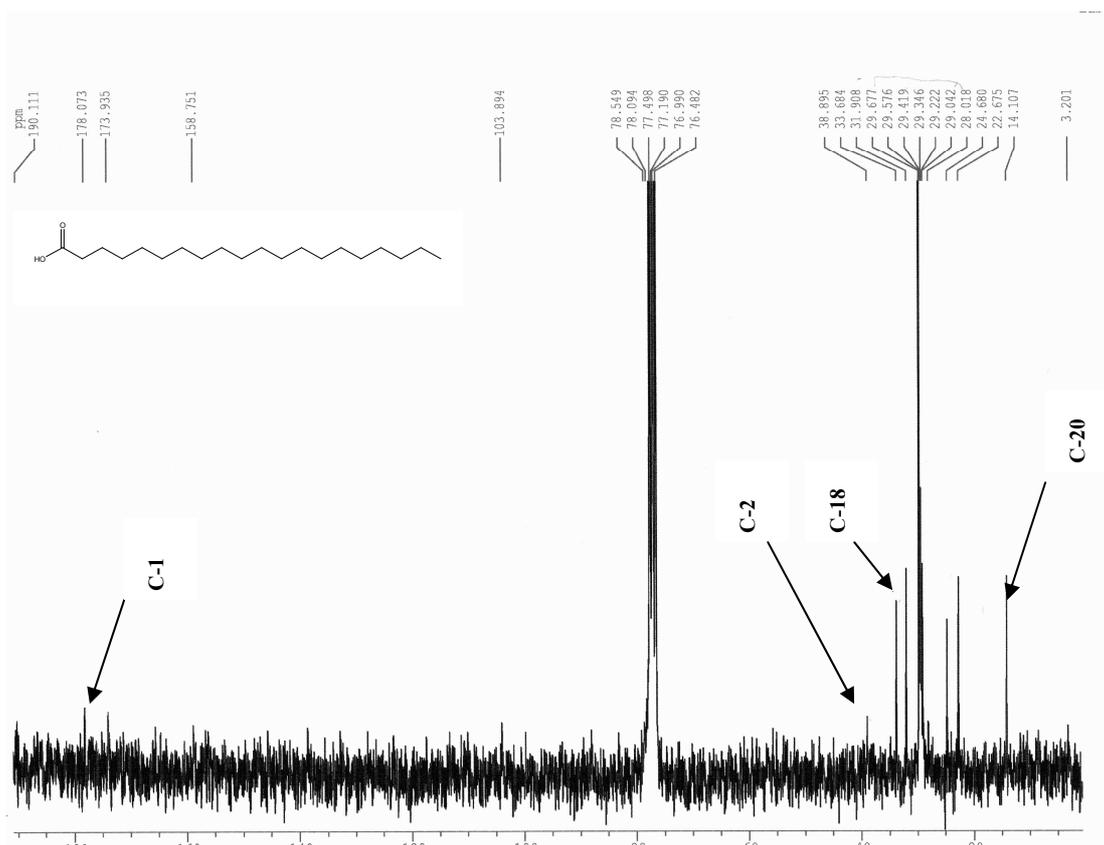


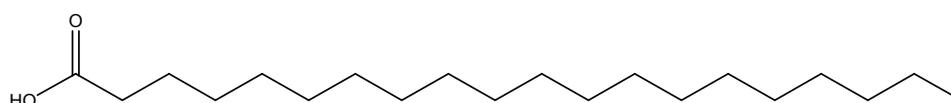
Figure-73 : Spectre RMN- C^{13} (63MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé C-f65.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé C-f65 sont représentées dans le tableau-63.

Tableau-63: Déplacements chimiques des protons et des carbones du composé C-f65.

Numéro de carbone	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1C	-	178,0
2 (CH ₂)	2,32 t	38,8
3 (CH ₂)	1,6 m	24,6
4 (CH ₂)	1,25 m	29,2
5 (CH ₂)	1,25 m	29,4
6 (CH ₂)	1,25 m	29,6
7 (CH ₂)	1,25 m	29,6
8 (CH ₂)	1,25 m	29,6
9 (CH ₂)	1,25 m	29,6
10 (CH ₂)	1,25 m	29,6
11 (CH ₂)	1,25 m	29,6
12 (CH ₂)	1,25 m	29,6
13 (CH ₂)	1,25 m	29,6
14 (CH ₂)	1,25 m	29,6
15 (CH ₂)	1,25 m	29,6
16 (CH ₂)	1,25 m	29,6
17 (CH ₂)	1,25 m	29,6
18 (CH ₂)	1,25 m	31,9
19 (CH ₂)	1,33 m	22,6
20 (CH ₃)	0,88 t	14,1

L'analyse des spectres infrarouge, EI-MS et RMN proton et carbone du composé C-f65 permet d'attribuer la structure : acide icosanoïque correspondant à la formule C₂₀H₄₀O₂.



acide icosanoïque

V-3-Fractionnement bioguidé de principes inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles :

V-3-1-Identification des produits de l'extrait butanolique :

Le fractionnement bioguidé de la phase butanolique a permis d'isoler cinq produits : B₃₋₄, B₃₋₈, B₃₋₁₀, B₃₋₁₂ et B₃₋₁₅ avec 90%, 80%, 98%, 95% et 98% de pureté. Ces produits sont identifiés par les différentes techniques spectrales : RMN-H¹, RMN-C¹³, COSY, HSQC, HMBC et EI-MS.

V-3-1-1- Elucidation structurale du composé B₃₋₄ :

Le spectre proton enregistré dans le CD₃OD à 500 MHz (figure-74 et 75, tableau-64) montre la présence de deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,30$ et $7,01$ ppm avec des constantes de couplages respectives ($J = 2$ et $8,2$ Hz) caractéristiques des protons aromatiques en couplages méta et ortho, le doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7,23$ ppm avec les constantes de couplages ($J = 2$ et $8,2$ Hz) est caractéristique d'un autre proton aromatique ortho méta couplé. Ces trois protons indiquent la présence d'un système ABX. Nous remarquons aussi la présence de deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,77$ et $6,4$ ppm avec la même constante de couplage ($J = 15,8$ Hz) caractéristiques des protons oléfiniques en position trans. Ces résultats suggèrent la présence d'un groupement trans-caffeoyl, ce qui nous permet d'attribuer les signaux à $\delta = 7,30$, $7,23$ et $7,01$ ppm aux carbones C-2', C-6' et C-5' respectivement. Les deux singulets à $\delta = 6$ et $5,75$ ppm d'intégration 1H chacun sont caractéristiques des protons méthines oxygénés (Maier et al 2006, Gil et al 2003).

Tableau-64 : Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit B₃₋₄.

δ ppm	intégration	Multiplicité	Constante de couplage	Attribution
7,77	1H	d	15,8	H-7'
7,30	1H	d	2	H-2'
7,23	1H	dd	8,2 et 2	H-6'
7,01	1H	d	8,2	H-5'
6,4	1H	d	15,8	H-8'
6	1H	s	-	H-2
5,75	1H	s	-	H-3

* : spectre enregistré dans le CD₃OD.

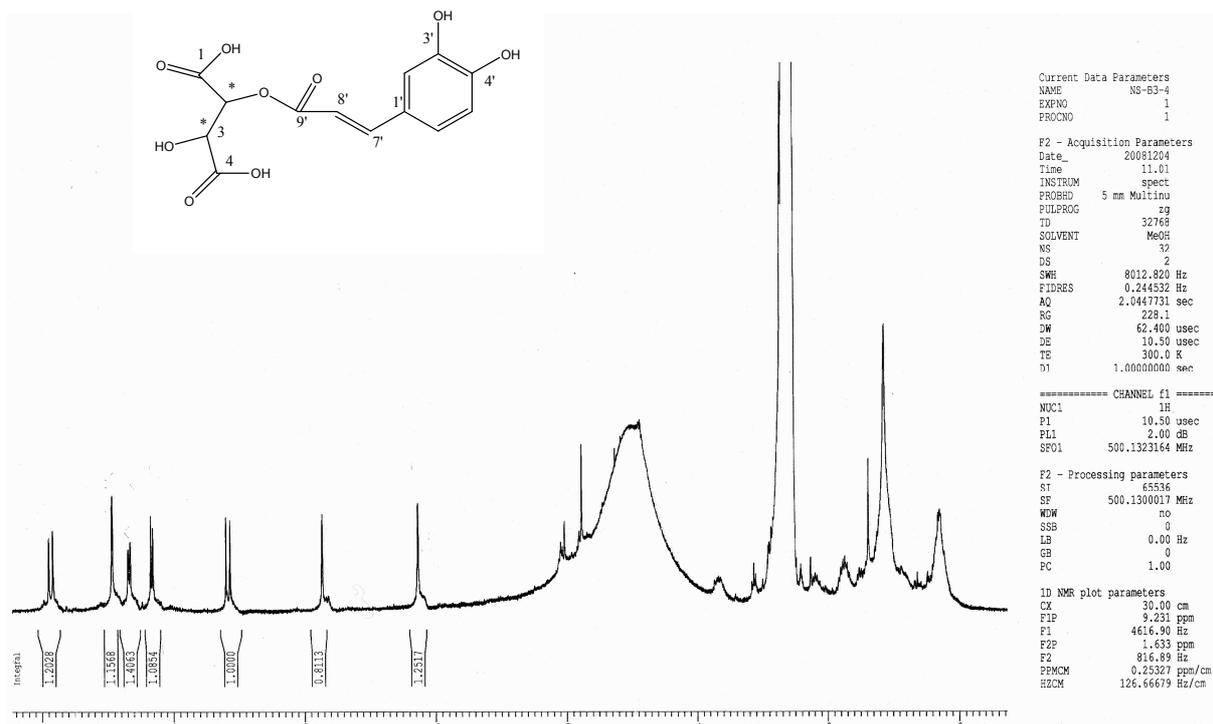


Figure-74 : Spectre RMN-H¹ (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du produit B₃₋₄.

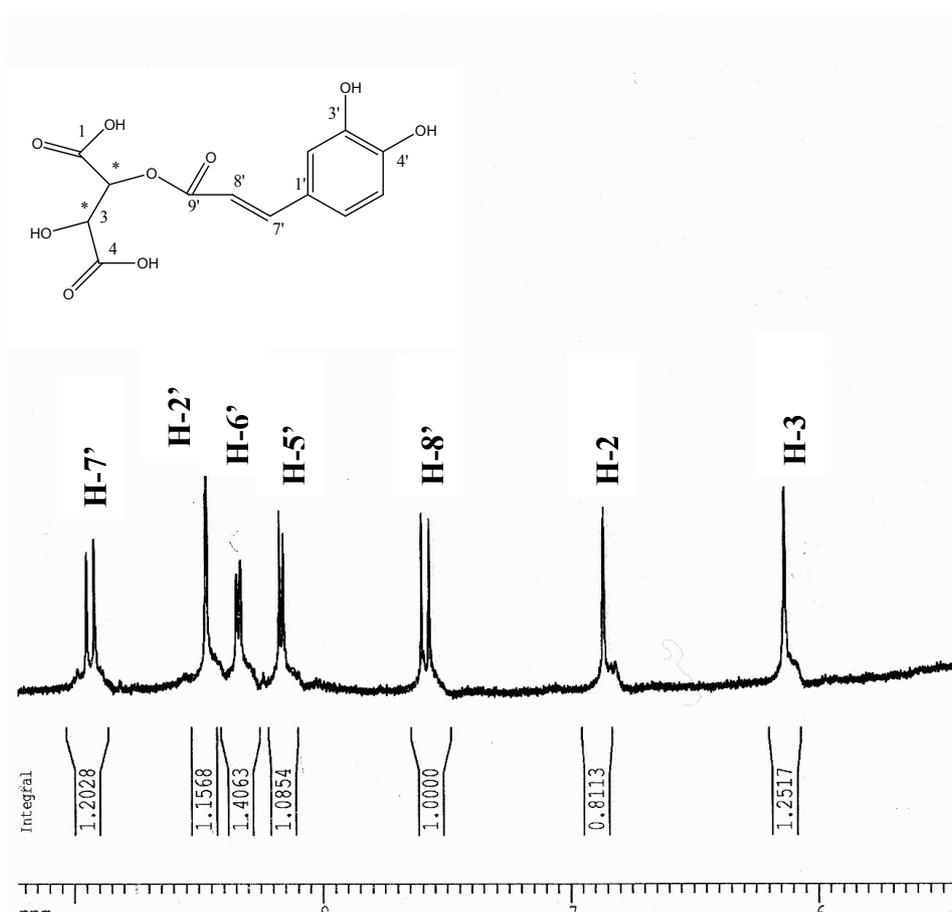


Figure-75 : Etallement du spectre RMN-H¹ du produit B₃₋₄.

Le spectre de masse en impact électronique (figure-76, tableau-65) a donné un pic $[M]^+$ à $m/z = 312$ ce qui correspond à la formule $C_{13}H_{12}O_9$. Les fragments à $m/z = 162$ et $m/z = 132$ correspondent aux pics $[M\text{-acide tartarique}]^+$ et $[M\text{-acide caféique}]^+$ (Llorach et al 2008, Lee et Scagel 2009). Ces résultats nous permettent d'attribuer les signaux à $\delta = 6$ et $5,75$ ppm aux protons H-2 et H-3 (de l'acide tartarique) respectivement.

Tableau-65: Fragmentation du produit B₃₋₄.

Pics fragments	m/z	%
$[M]^+$	312	15
$[C_4H_6O_6]^+$	150	100
$[M-C_4H_6O_6]^+$	162	20
$[M-C_9H_8O_4+H]^+$	132	30

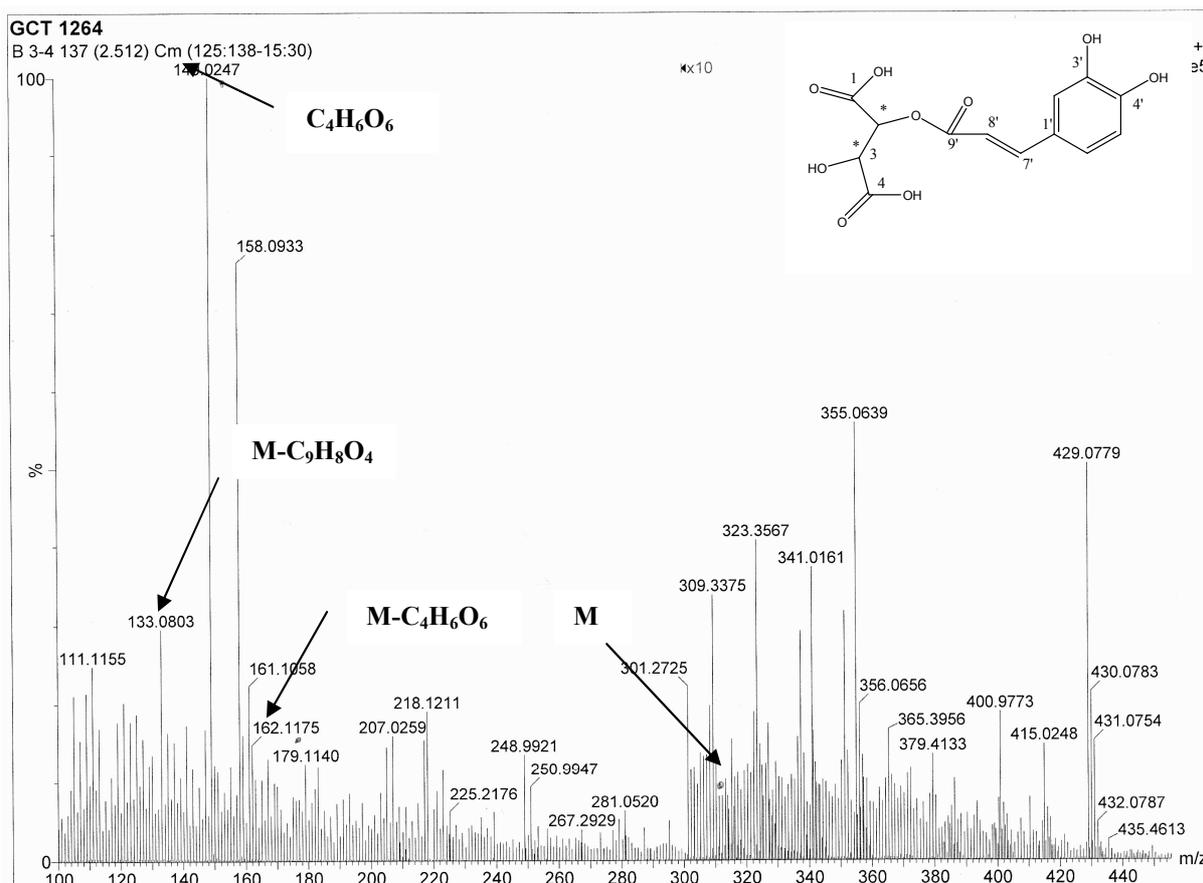


Figure-76 : Spectre EI-MS du produit B₃₋₄.

Le spectre COSY (figure-77) montre que le H-7' à $\delta = 7,77$ ppm corrèle avec le H-8' à $\delta = 6,4$ ppm et que le H-6' à $\delta = 7,23$ ppm corrèle avec les protons H-5' et H-2' à $\delta = 7,01$ ppm et $\delta = 7,30$ ppm respectivement. De plus le proton H-2 à $\delta = 6$ ppm corrèle avec le proton H-3 à $\delta = 5,75$ ppm.

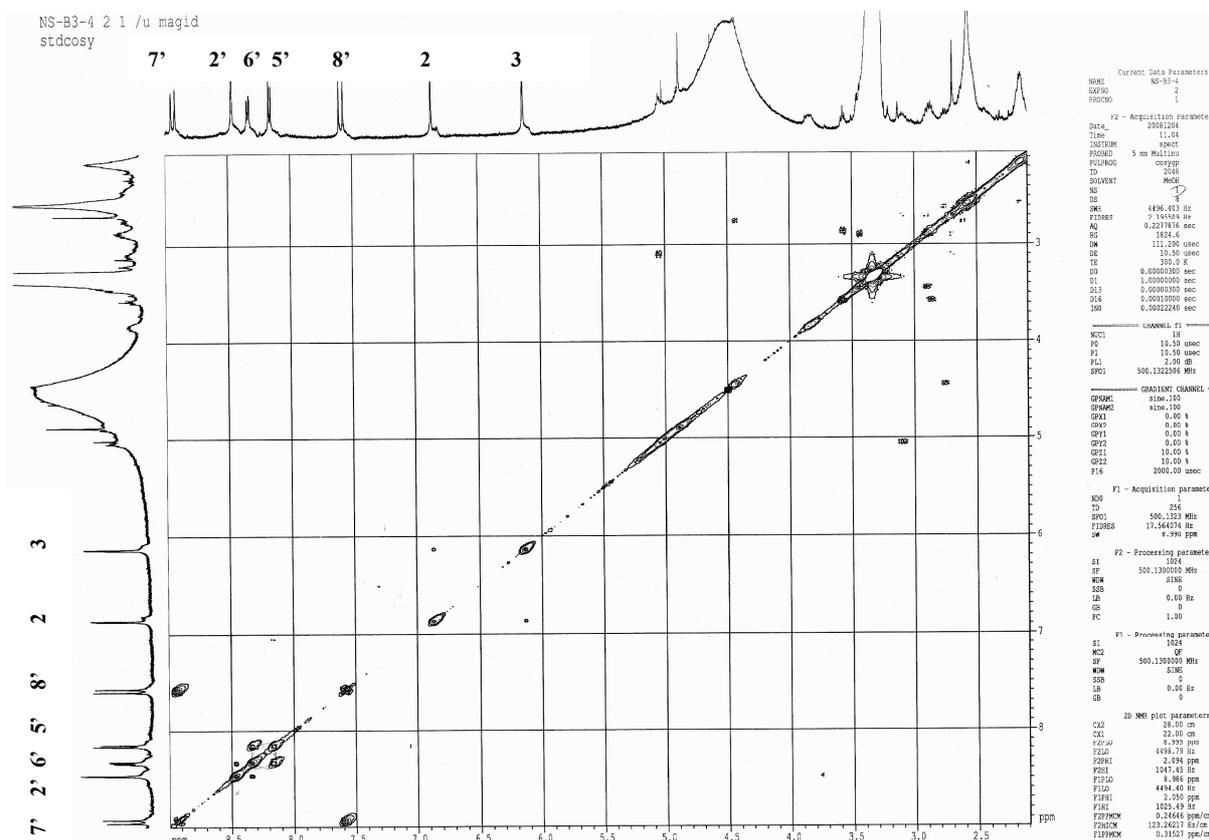


Figure-77 : Spectre COSY (500MHz, CD₃OD) du composé B₃₋₄.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure-78) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants comme suit :

- ✓ La corrélation du proton H-2' avec le carbone C-2' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 115$ ppm.
- ✓ La corrélation du proton H-6' avec le carbone C-6' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 123$ ppm.
- ✓ La corrélation du proton H-5' avec le carbone C-5' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 116$ ppm.

- ✓ La corrélation du proton H-8' avec le carbone C-8' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 114$ ppm.
- ✓ La corrélation du proton H-2 avec le carbone C-2 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 73$ ppm.
- ✓ La corrélation du proton H-3 avec le carbone C-3 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 72$ ppm.

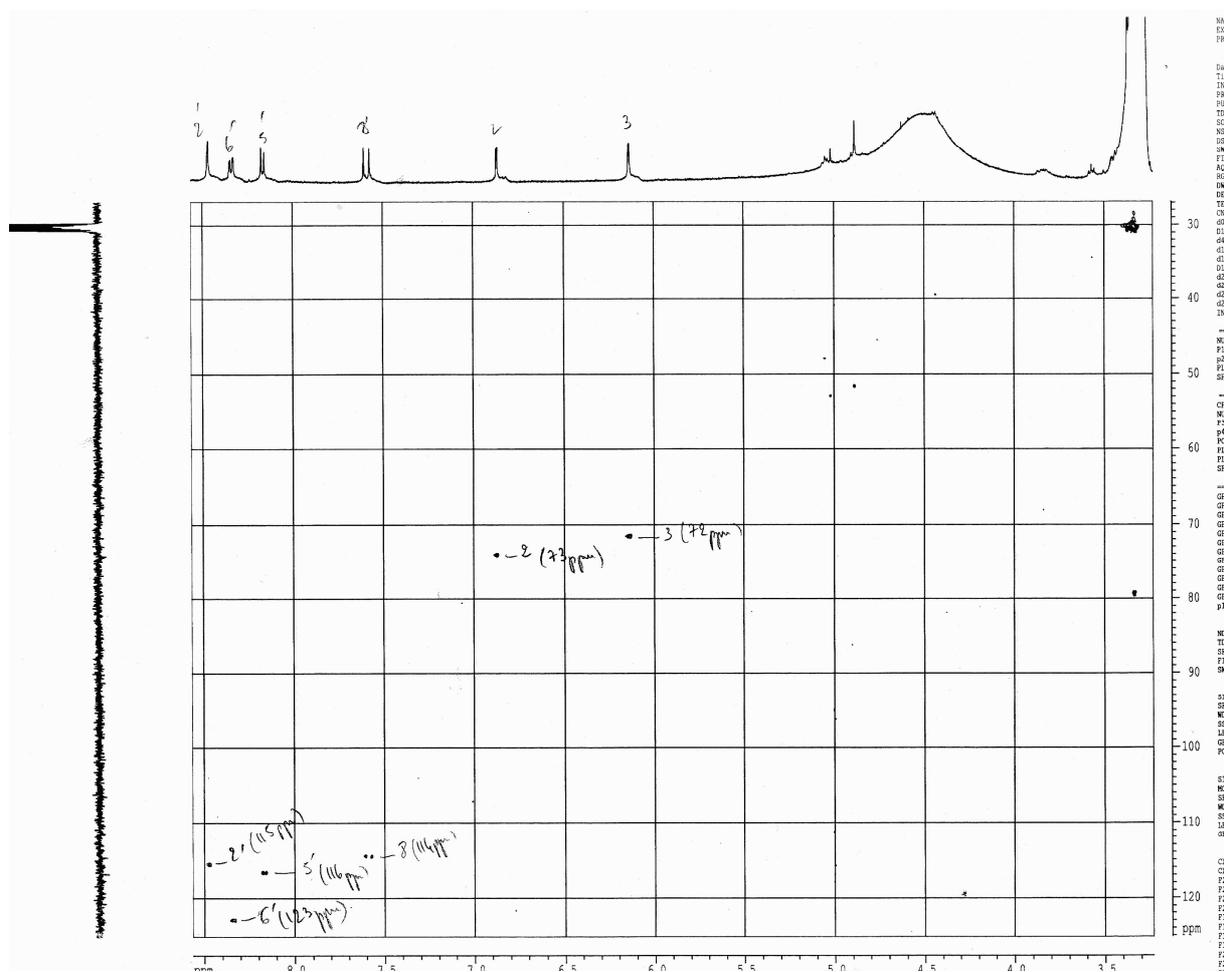


Figure-78 : Spectre HSQC (500MHz, CD₃OD) du composé B₃₋₄.

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure 79 et 80) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

- Le proton oléfinique en couplage trans H-7' donne trois tâches de corrélation avec les atomes de carbone à $\delta = 167,4$ ppm, $\delta = 123,2$ ppm et $\delta = 114,3$ ppm attribuables aux carbones C-9', C-6' et C-8' respectivement.

- Les protons H-2' et H-5' corrélient avec les atomes de carbone à $\delta = 146,7$ ppm et $\delta = 149,7$ ppm attribuable aux carbones C-3' et C-4'. Le proton H-2' corrélie en plus avec un atome de carbone à $\delta = 114,3$ ppm attribuable au carbone C-6'. Par contre, le proton H-5' corrélie avec un atome de carbone à $\delta = 128,2$ ppm attribuable au carbone C-8'.
- Le proton H-8' montre deux tâches de corrélation avec les atomes de carbone à $\delta = 128,2$ ppm et $\delta = 167,4$ ppm attribuables aux carbones C-1' et C-9'.
- Le proton H-3 montre une tâche de corrélation avec l'atome de carbone à $\delta = 170,7$ ppm attribuable au carbone C-1. Ce carbone correspond à la première fonction acide de l'acide tartarique.
- Le proton H-2 montre une tâche de corrélation avec l'atome de carbone à $\delta = 169,9$ ppm attribuable au carbone C-4. Ce carbone correspond à la deuxième fonction acide de l'acide tartarique.

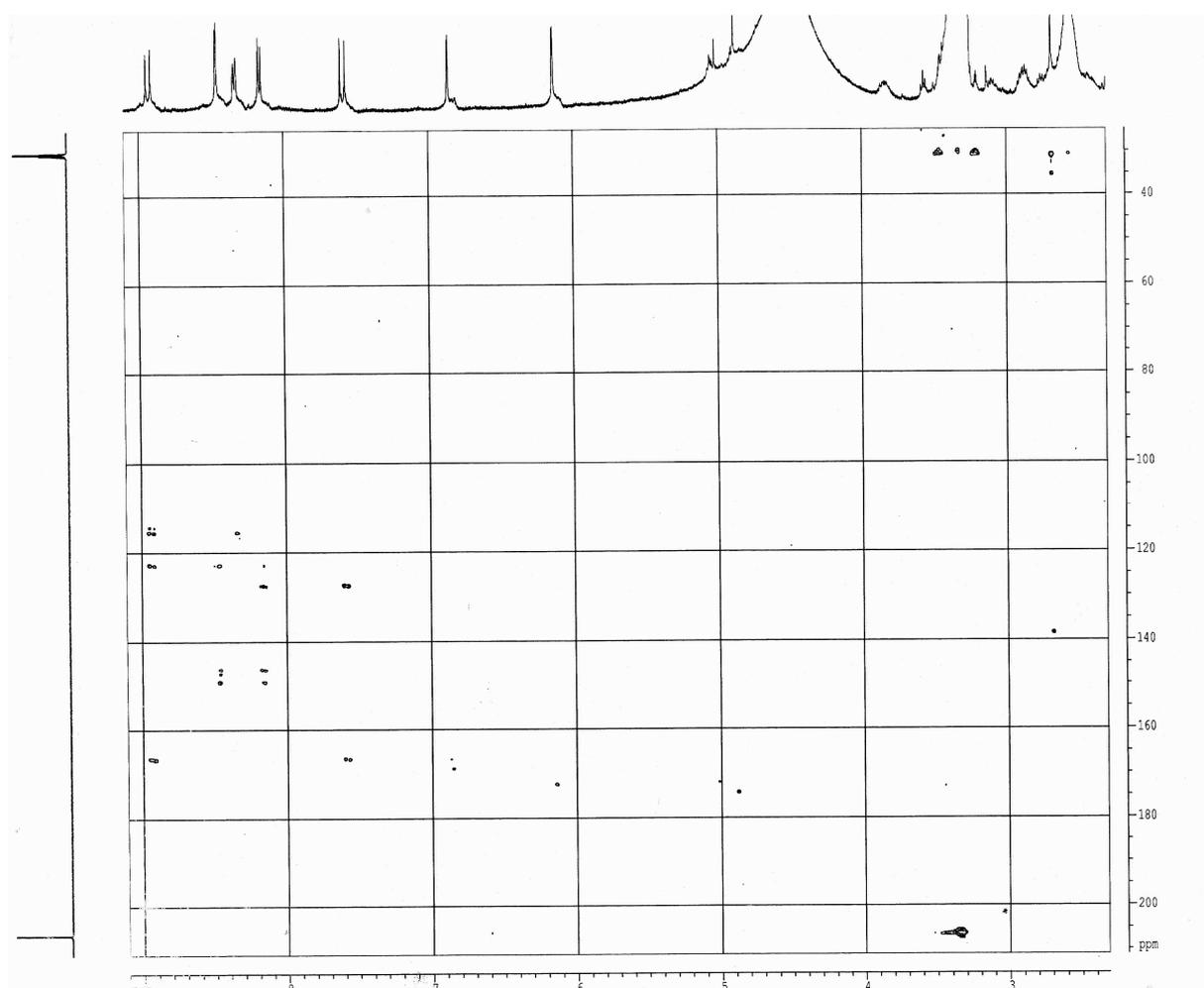


Figure-79 : Spectre HMBC (500MHz, CD₃OD) du produit B₃₋₄.

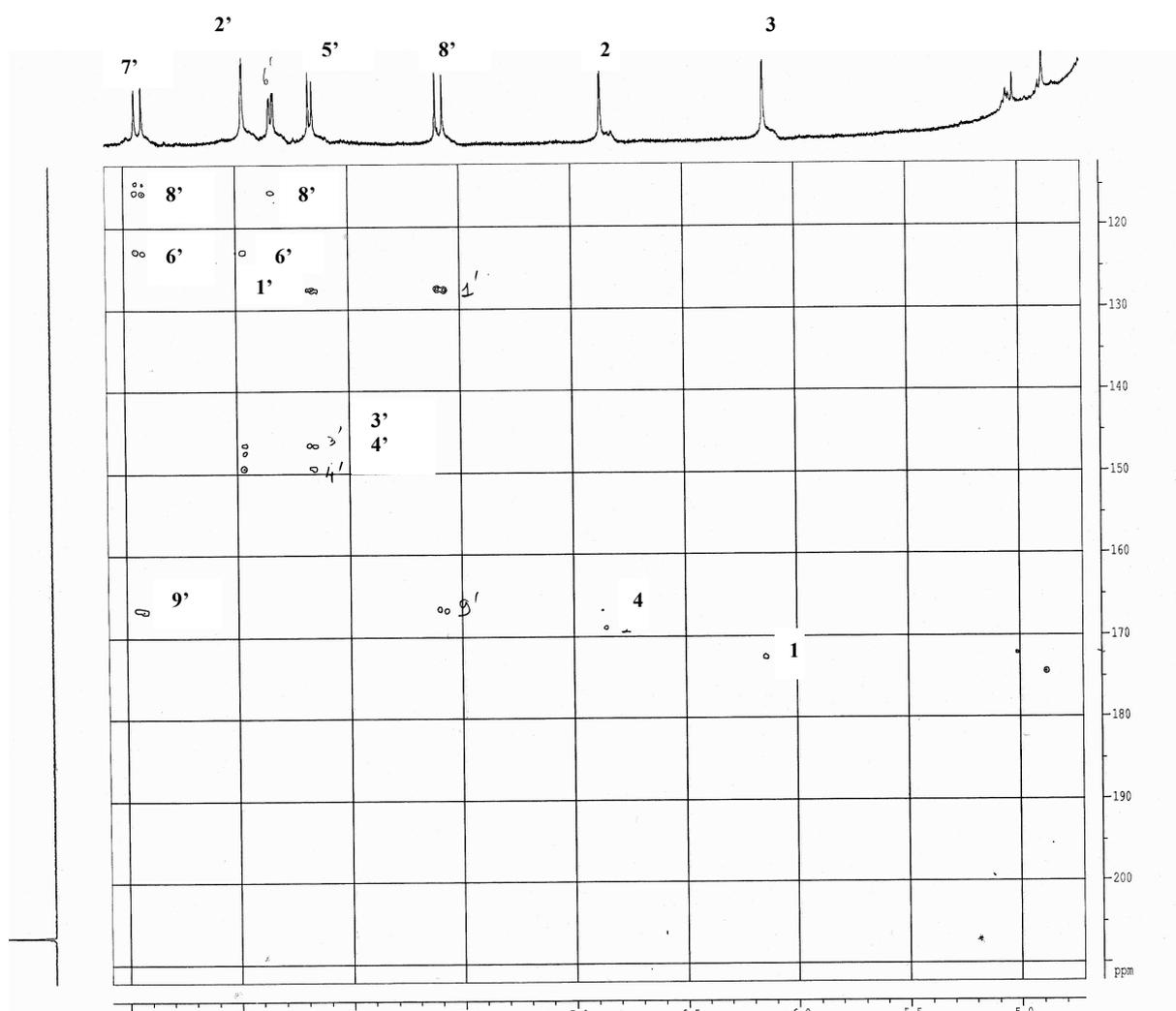


Figure-80 : Etallement du spectre HMBC du produit B₃₋₄.

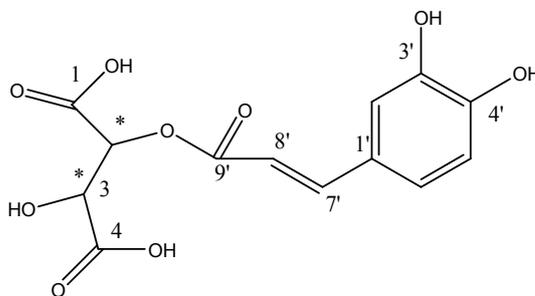
Les données de la RMN-HSQC et HMBC nous ont permis d'attribuer les différents déplacements chimiques des atomes de carbone. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau 66.

Tableau-66: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé B_{3.4}.

Carbone	Déplacements chimiques
1	169,9
2	73,0
3	72,0
4	170,7
1'	128,2
2'	115,4
3'	146,7
4'	149,7
5'	116,0
6'	123,2
7'	147,8
8'	114,3
9'	167,4

* : le spectre est enregistré dans le CD₃OD.

L'ensemble des données spectroscopiques et analytiques nous permettent d'identifier le composé B_{3.4} comme étant l'acide monocaffeoyl tartarique. Afin de déterminer la stéréochimie de ce composé, son pouvoir rotatoire est mesuré à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241. Le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = -17$. La structure de ce composé est donc acide caffeoyl-(2R,3R)-tartarique (acide caftarique). Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Cheminat *et al* 1988). Ce composé est isolé pour la première fois de la propolis.



Acide caffeoyl-(2R,3R)-tartarique (acide caftarique).

V-3-1-2-Elucidation structurale du composé B₃₋₈ :

Le spectre RMN du proton enregistré dans le CD₃OD à 500MHz (figure-81 et 82, tableau-67) montre qu'il s'agit d'un composé aromatique caractérisé par :

- deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,65$ ppm et $\delta = 6,35$ ppm avec une même constante de couplage ($J = 15,8$ Hz) caractéristiques des protons éthyléniques en position trans.
- La présence de deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,25$ ppm et $\delta = 6,95$ ppm avec des constantes de couplages différentes ($J = 1,8$ Hz et $J = 8,2$ Hz) montre que ces protons sont ortho et méta couplés à un troisième proton qui se présente sous forme d'un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7,05$ ppm ($J = 8,2$ et $1,8$ Hz). L'ensemble de ces données montre que le noyau aromatique est tri substitué (1, 3 et 4).

Tableau-67: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit B₃₋₈.

δ ppm	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage	Attribution
7,65	1H	d	15,8	H-7
7,25	1H	d	1,8	H-2
7,05	1H	dd	8,2 et 1,8	H-6
6,95	1H	d	8,2	H-5
6,35	1H	d	15,8	H-8

* : spectre enregistré dans le CD₃OD.

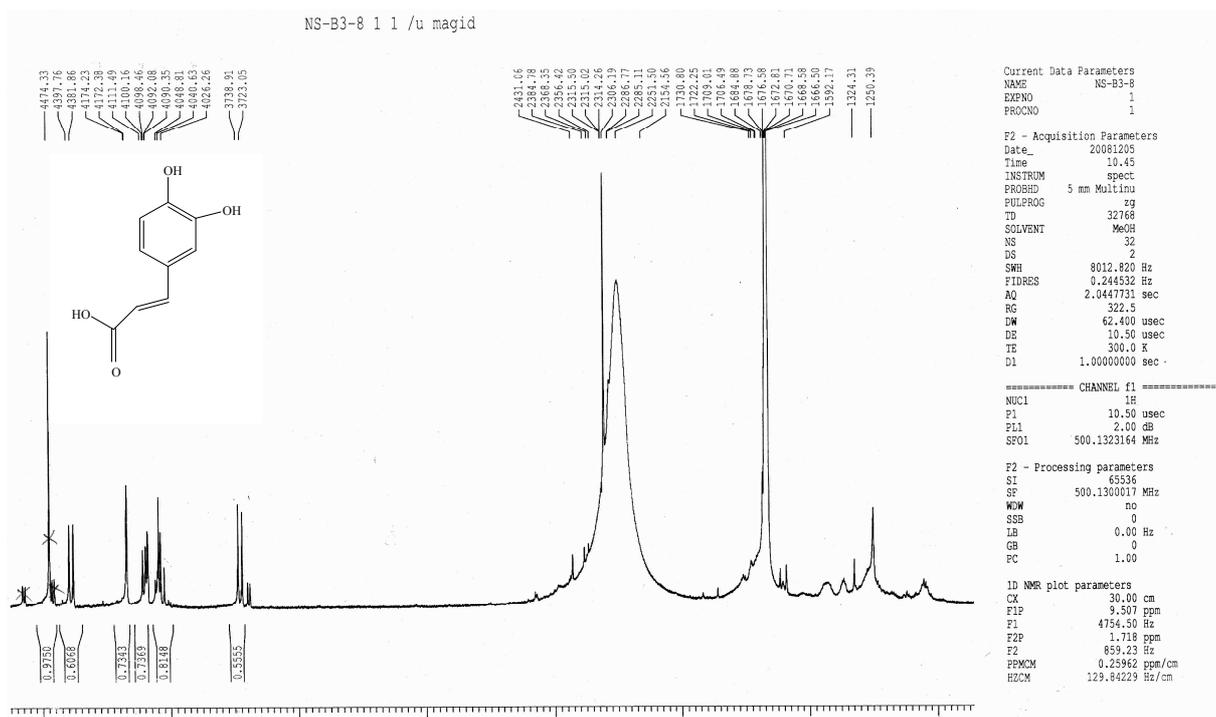


Figure-81 : Spectre RMN-H¹ (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du produit B₃₋₈.

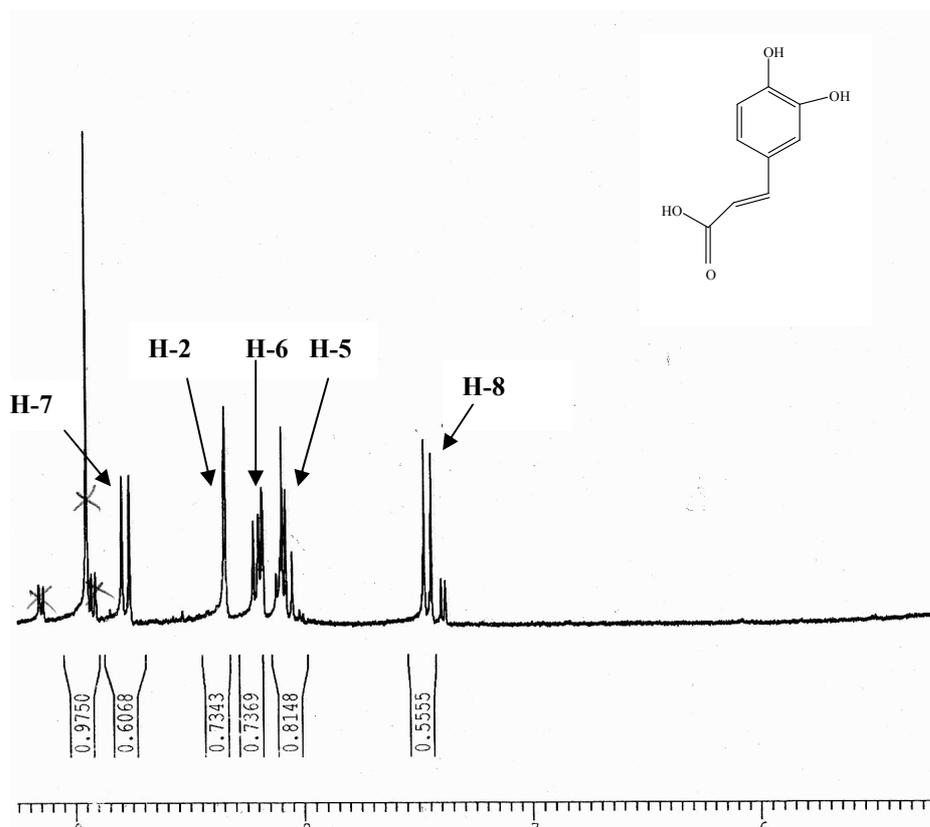


Figure-82 : Etaiement du spectre RMN-H¹ du produit B₃₋₈.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure-83 et 84) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants comme suit :

- La corrélation du proton H-7 avec le carbone C-7 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 146,8$ ppm.
- La corrélation du proton H-2 avec le carbone C-2 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 114,5$ ppm.
- La corrélation du proton H-6 avec le carbone C-6 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 122,7$ ppm.
- La corrélation du proton H-5 avec le carbone C-5 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 115,9$ ppm.
- La corrélation du proton H-8 avec le carbone C-8 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 115,3$ ppm.

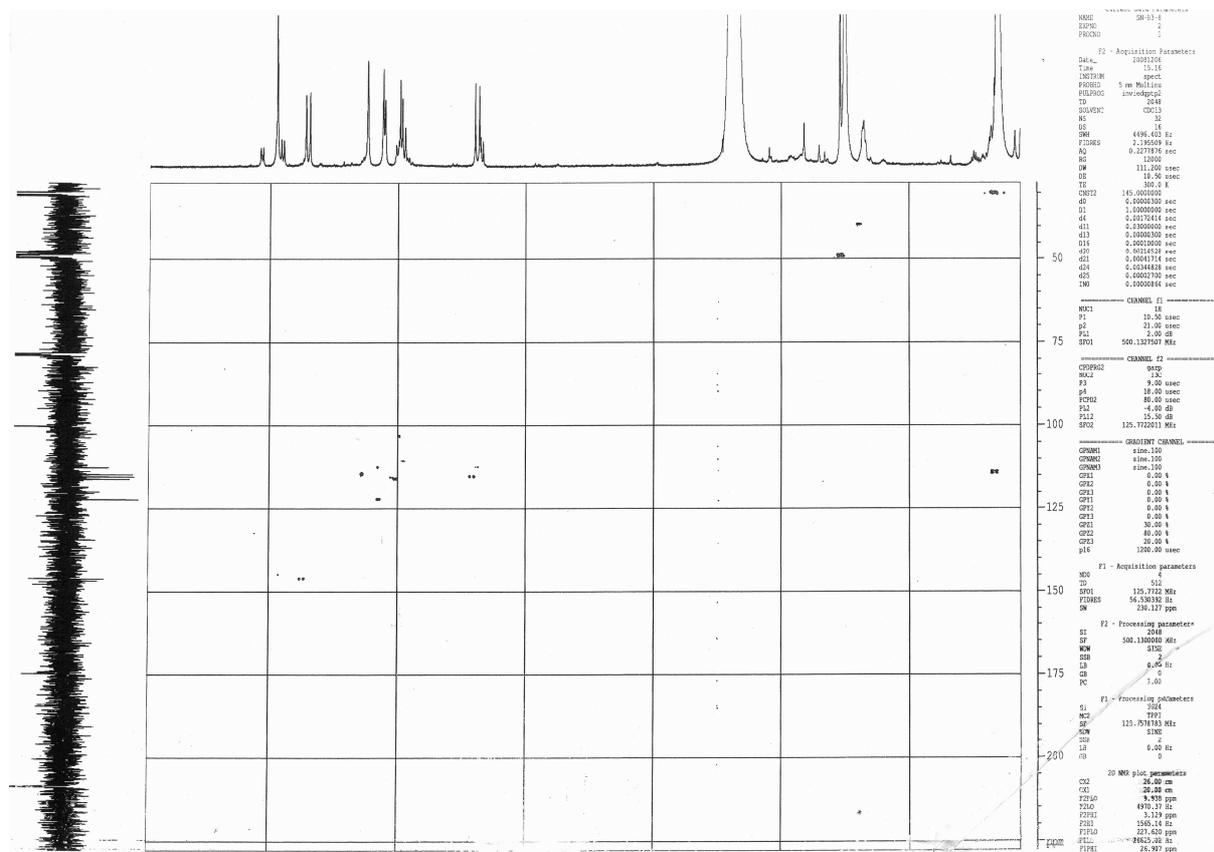


Figure-83 : Spectre HSQC (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du produit B_{3.8}.

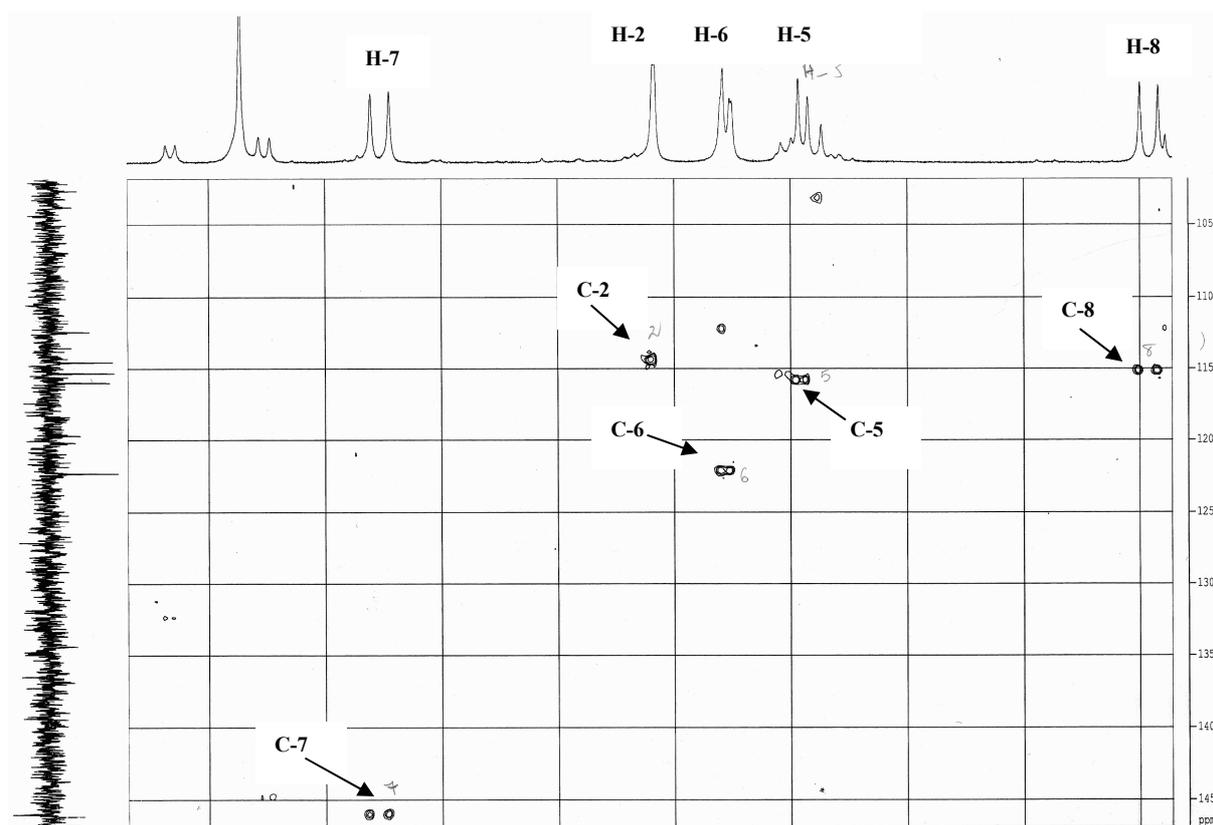


Figure-84 : Etallement du spectre HSQC du produit B₃₋₈.

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure 85 et 86) mettant en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance permet de tirer les indications suivantes :

- Le proton H-7 montre quatre tâches de corrélations :
 - La première avec un atome de carbone à $\delta = 115,3$ ppm attribuable au carbone C-8.
 - La deuxième avec un atome de carbone à $\delta = 115,9$ ppm attribuable au carbone C-5.
 - La troisième avec un atome de carbone à $\delta = 127,6$ ppm attribuable au carbone C-6.
 - La dernière avec un atome de carbone à $\delta = 170,0$ ppm attribuable au carbone C-9.
- Le proton H-2 montre trois tâches de corrélations :
 - La première avec un atome de carbone à $\delta = 122,7$ ppm attribuable au carbone C-6.
 - La deuxième avec un atome de carbone à $\delta = 146,6$ ppm attribuable au carbone C-3.
 - La dernière avec un atome de carbone à $\delta = 149,2$ ppm attribuable au carbone C-4.
- Le proton H-6 montre trois tâches de corrélation avec les atomes de carbone à $\delta = 115,9$ ppm, $\delta = 146,6$ ppm et $\delta = 149,2$ ppm attribuables aux carbones C-5, C-3 et C-4 respectivement.

- Le proton H-5 montre plusieurs tâches de corrélations réparties comme suit :
 - Une tâche de corrélation avec l'atome de carbone à $\delta = 127,6$ ppm attribuable au carbone C-1.
 - Deux tâches de corrélations avec les atomes de carbone à $\delta = 146,6$ et $149,2$ ppm attribuables aux carbones porteurs d'hydroxyles C-3 et C-4 respectivement.
- Le proton H-8 montre deux tâches de corrélations avec les atomes de carbone à $\delta = 127,6$ et $170,0$ ppm attribuables aux carbones C-1 et C-9 respectivement.

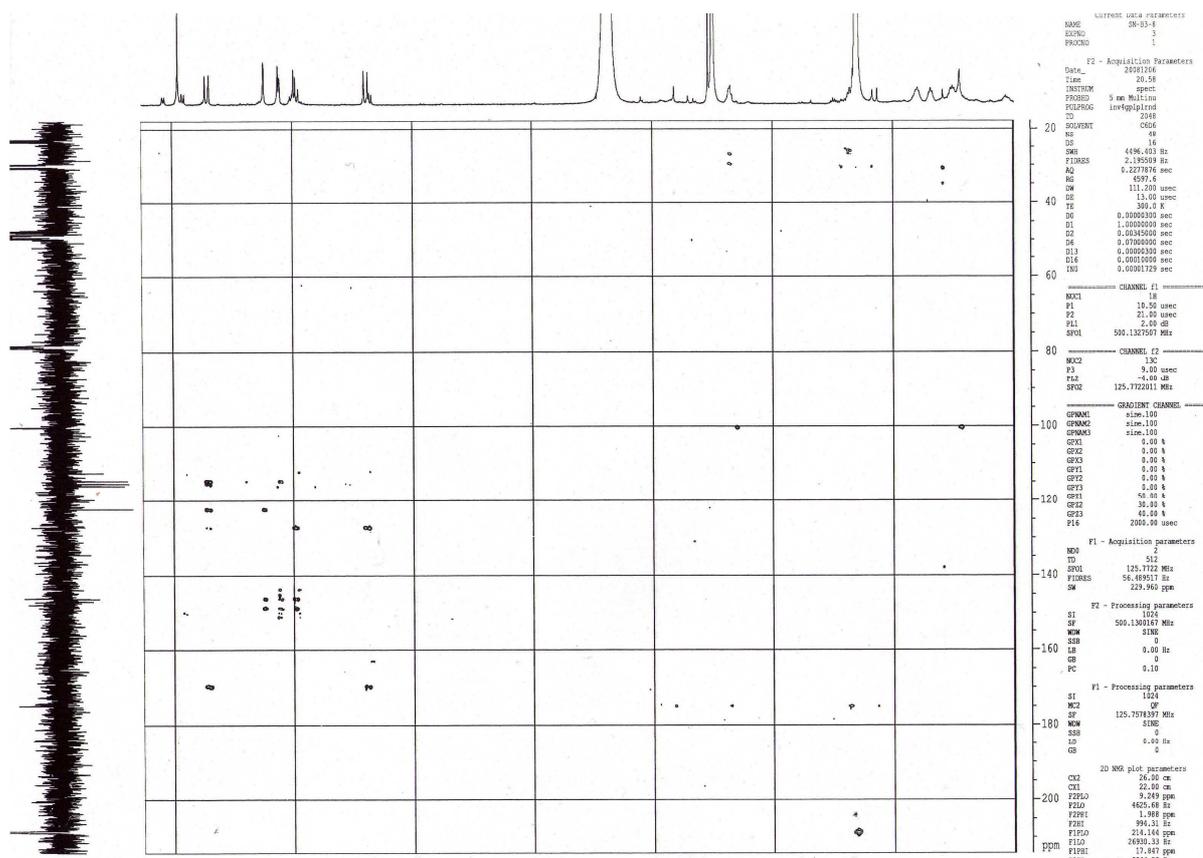


Figure-85 : Spectre HMBC (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du produit B₃₋₈.

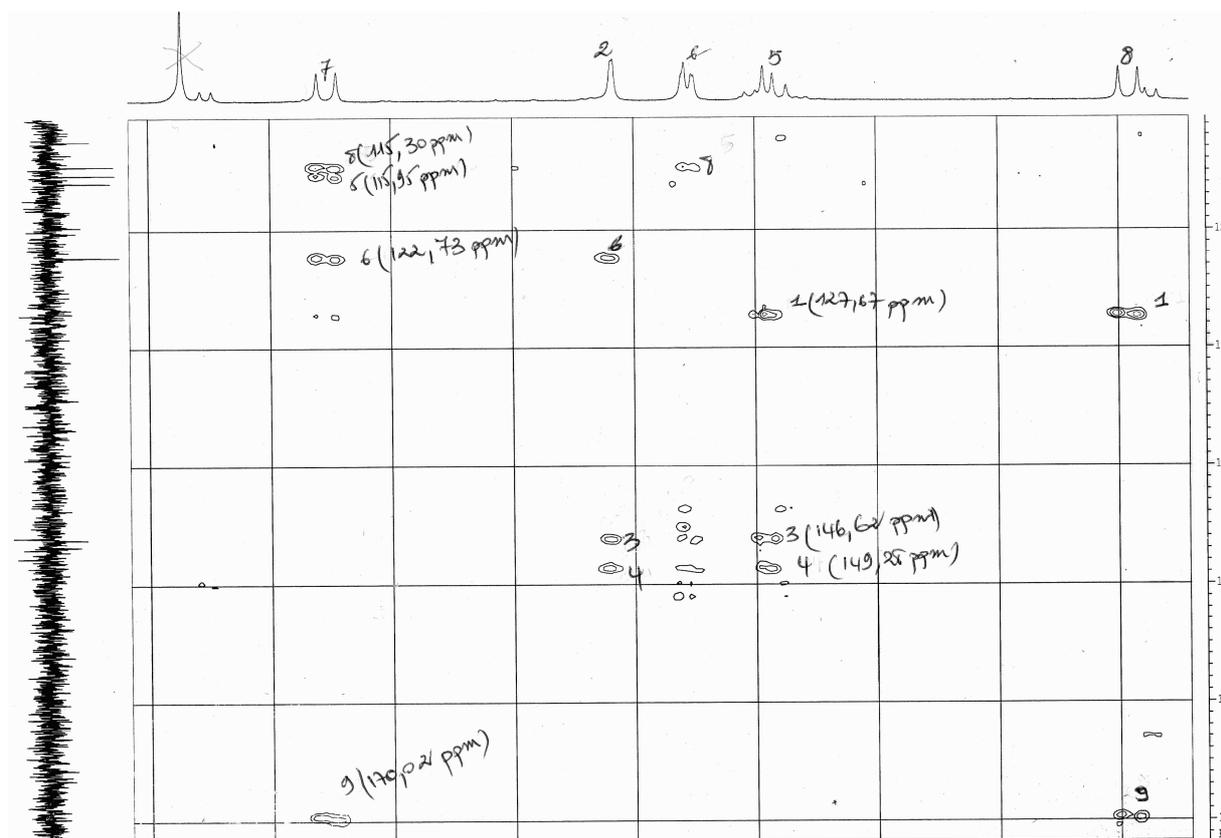


Figure-86 : étalement du spectre HMBC du produit B₃₋₈.

L'examen du spectre carbone J-modulé (figure-87) montre que ce composé possède 9 atomes de carbone dont l'un possède une fonction carbonyle (C=O) à $\delta = 170,0$ ppm qui nous oriente vers une fonction acide conjuguée. Les deux atomes de carbones éthyléniques résonnants à $\delta=115,3$ ppm et $\delta=146,8$ ppm confirment la présence de ces deux groupements observés en RMN- H^1 . Le spectre montre aussi la présence de deux atomes de carbone aromatiques oxygénés à $\delta= 146,6$ ppm et $\delta= 149,2$ ppm attribuables aux carbones C-3 et C-4 qui ne peuvent être substitués que par un groupement hydroxyle. L'ensemble de ces données laisse supposer que le groupement acide est lié à l'enchaînement CH=CH. Les données du spectre carbone J-modulé sont représentées dans le tableau-68.

Tableau-68: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé B₃₋₈.

Carbone	Déplacements chimiques
1	127,67
2	114,55
3	146,62
4	149,28
5	115,95
6	122,73
7	146,89
8	115,30
9	170,02

* : spectre enregistré dans le CD₃OD.

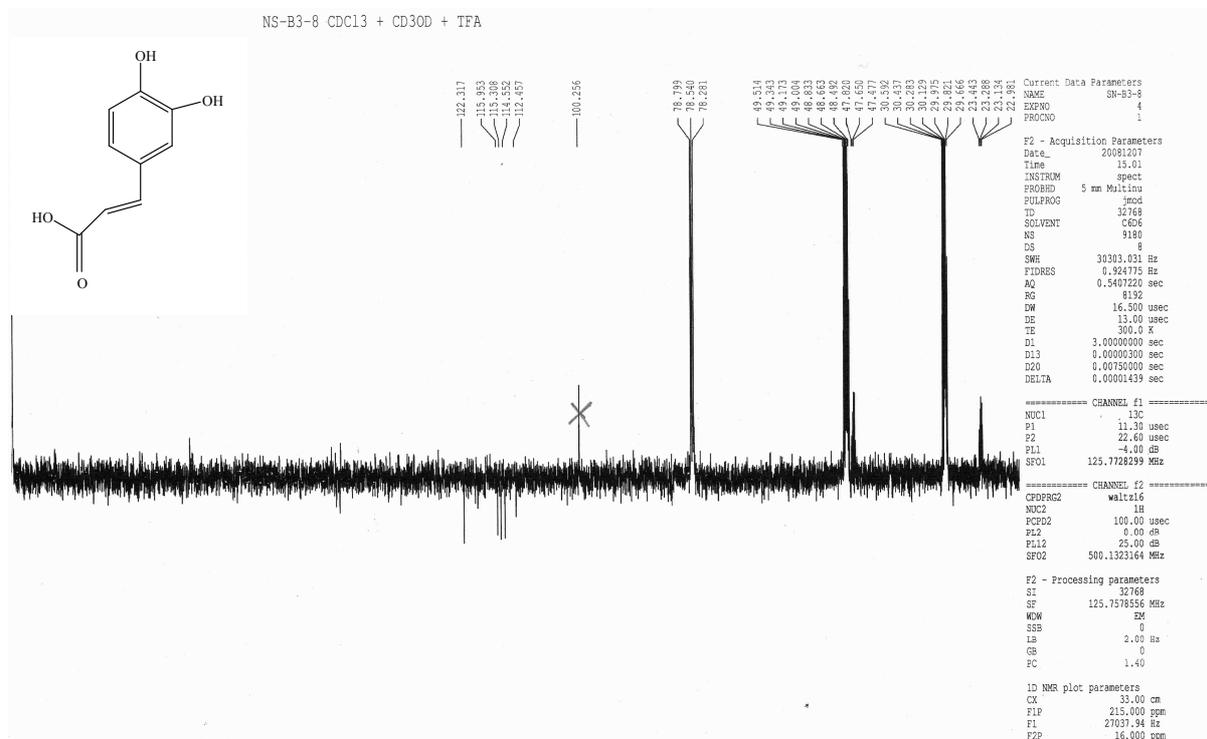


Figure-87 : spectre carbone J-modulé (125MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé B₃₋₈.

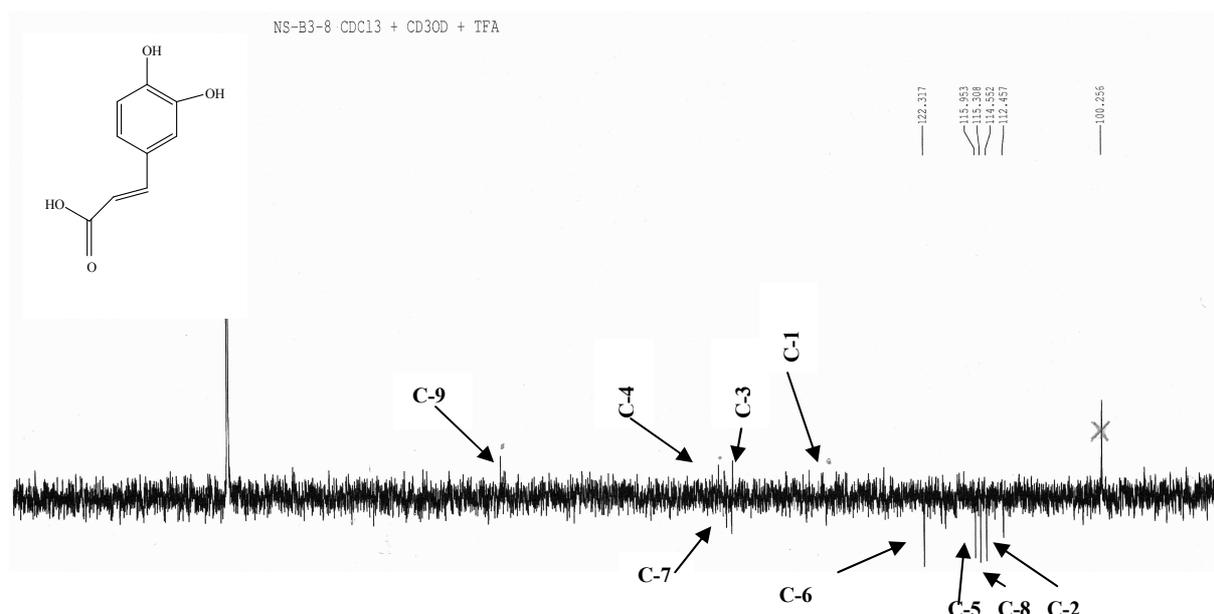


Figure-88: Etalement du spectre carbone J-modulé du composé B₃₋₈.

Le spectre de masse en impact électronique du composé B₃₋₈ (figure-89, tableau-69) a donné un pic [M]⁺ à $m/z= 180$ et un autre pic [M+H]⁺ à $m/z= 181$ correspondant à la formule C₉H₈O₄. Nous remarquons aussi la présence d'un pic [M-COO]⁺ à $m/z= 136$ et un pic $m/z= 109$ issu de la perte du radical (**·CH=CH-COOH**) (Lee *et al* 2009).

Tableau-69: Fragmentation du produit B₃₋₈.

Pics fragments	m/z
[M] ⁺	180
[M+H] ⁺	181
[M-COO] ⁺	135
[M-C ₃ H ₃ O ₂] ⁺	109

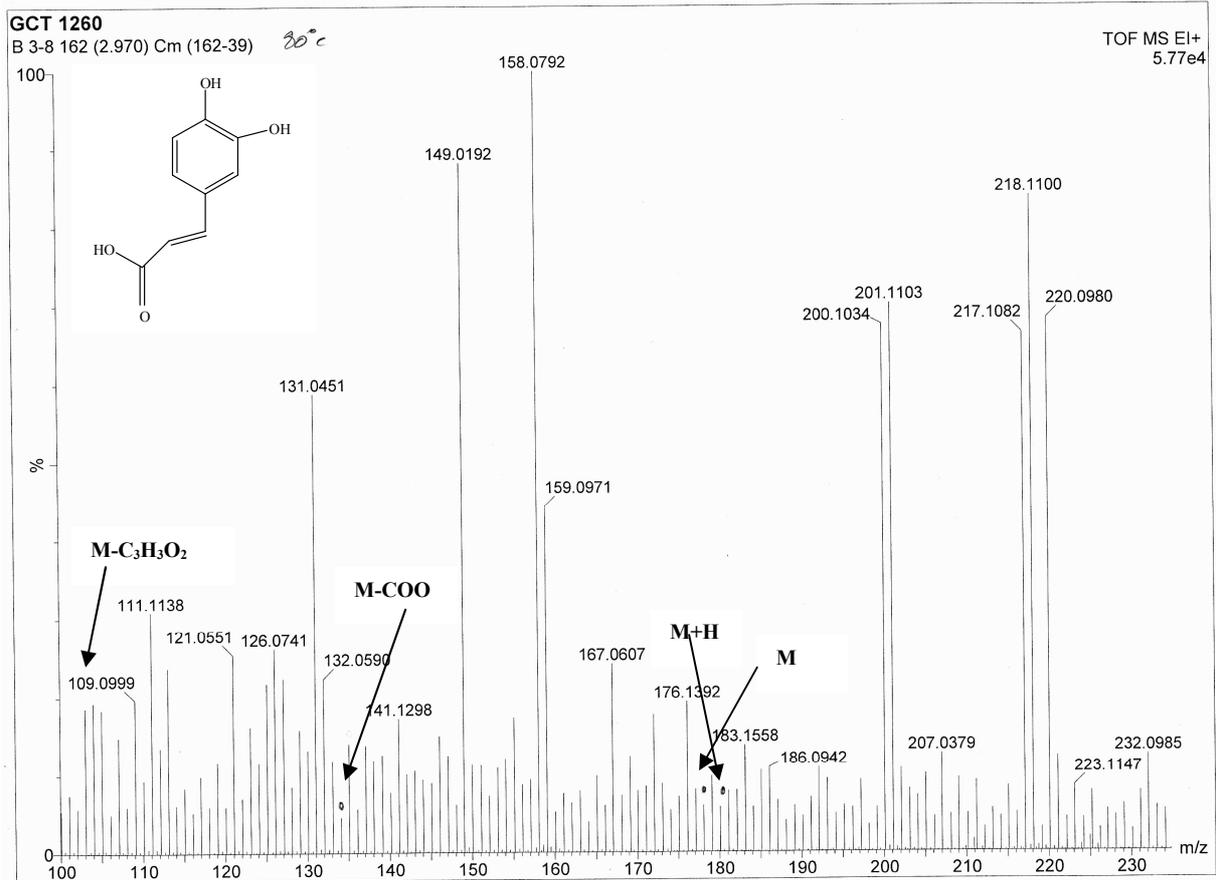
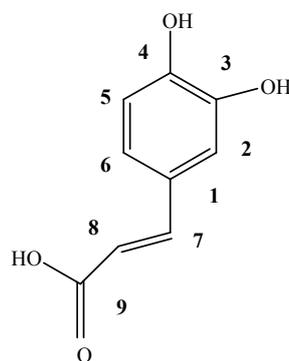


Figure-89 : Spectre EI-MS du produit B₃₋₈.

L'ensemble des données spectroscopiques et analytiques nous permettent d'identifier le composé B₃₋₈ comme étant l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Lim *et al* 2007, Flamini *et al* 2001 et Gil *et al* 2003. Ce produit a été isolé à partir de la propolis par Cizmarik *et al* 1970, Qiao *et al* 1991 et par Banskota *et al* 2002 et détecté par GC-MS au niveau des propolis d'Égypte (Hegazi *et al* 2002, Add Elhady *et al* 2002 et 2007), de Turquie (Kartal *et al* 2002), de Grèce et par HPLC et HPLC couplée à la spectrométrie de masse (Bonvehi *et al* 1994, Gregoris *et al* 2010, Kumazawa *et al* 2004).



acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique).

V-3-1-3-Elucidation structurale du composé B₃₋₁₀ :

Le spectre RMN-H¹ du composé B₃₋₁₀ enregistré dans le CD₃OD à 500MHz est comparable à celui du composé B₃₋₄ à une exception près, celle-ci est due à la présence d'un groupement méthoxyle qui apparait sous forme d'un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,8$ ppm.

Le spectre proton (figure-90, tableau-70) montre huit signaux dont cinq sont relatifs au groupement cafféoyl. Ces derniers apparaissent comme suit :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,8$ et $6,4$ ppm avec une même constante de couplage : ($J = 15,8$ Hz) attribuables aux protons H-7' et H-8' respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,1$ ppm ($J = 1,8$ Hz) attribuable au proton H-2'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 6,9$ ppm ($J = 8,2$ et $1,8$ Hz) attribuable au proton H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,8$ ppm ($J = 8,2$ Hz) attribuable au proton H-5'.

Le spectre montre aussi deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta = 5,5$ et $5,1$ ppm caractéristiques des protons méthines oxygénés attribuables aux protons H-2 et H-3.

Les données RMN-H¹ du composé B₃₋₁₀ sont représentées dans le tableau-70.

Tableau-70: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit B₃₋₁₀.

δ ppm	intégration	Multiplicité	Constante de couplage	Attribution
7,8	1H	d	15,8	H-7'
7,1	1H	d	1,8	H-2'
6,9	1H	dd	8,2 et 1,8	H-6'
6,8	1H	d	8,2	H-5'
6,4	1H	d	15,8	H-8'
5,5	1H	s	-	H-2
5,1	1H	s	-	H-3
3,8	3H	s	-	OMe

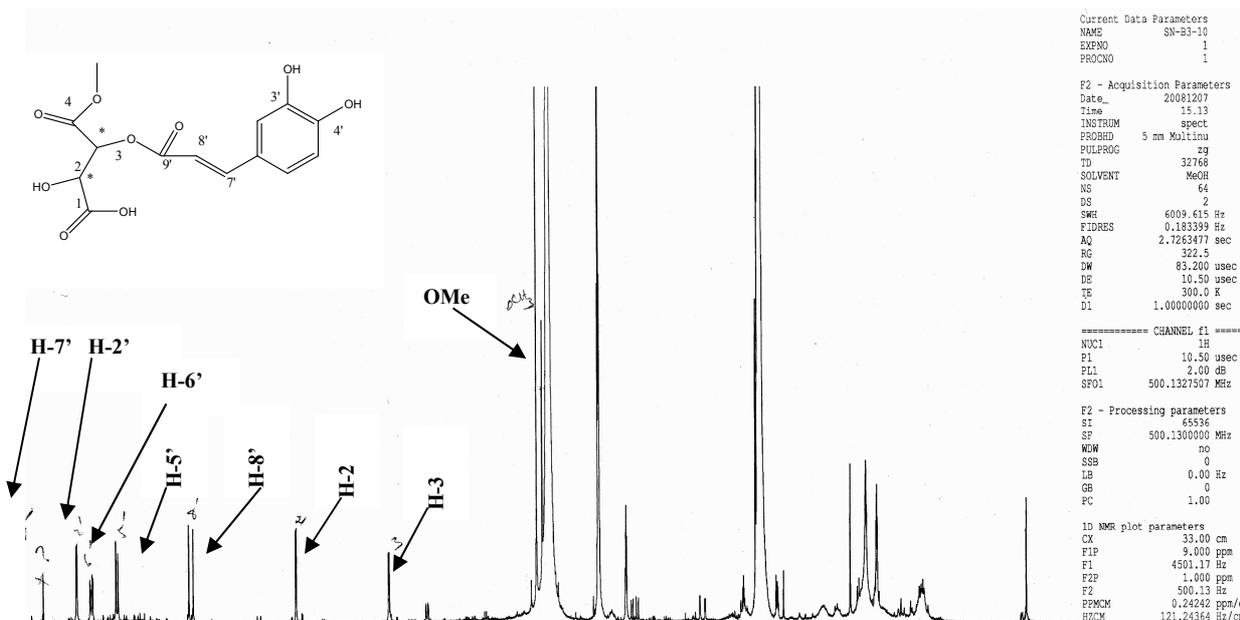


Figure-90 : Spectre RMN-H¹ (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du produit B₃-10.

Le spectre COSY (figure-91) montre que le H-7' à δ = 7,8 ppm corrèle avec le H-8' à δ = 6,4 ppm et que le H-6' à δ = 6,9 ppm corrèle les protons à δ = 6,8 ppm et δ = 7,1 ppm attribuables aux protons H-5' et H-2'. Le spectre montre aussi que le proton H-2 à δ = 5,5 ppm corrèle avec le proton H-3 à δ = 5,1 ppm.

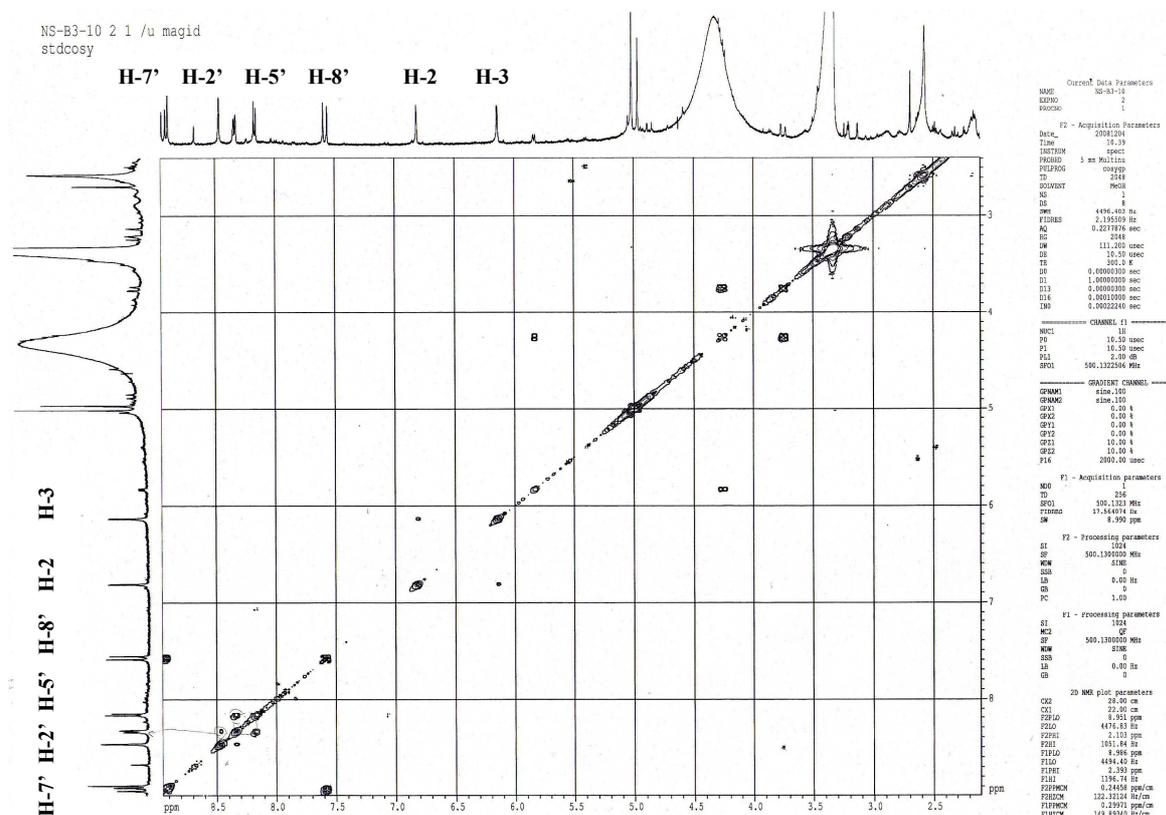


Figure-91 : Spectre COSY (500MHz, CD₃OD) du produit B₃-10.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure-92 et 93) permet l'attribution des signaux des atomes de carbone correspondants comme suit:

- La corrélation du H-7' avec le carbone C-7' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 148,0$ ppm.
- La corrélation du H-2' avec le carbone C-2' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 115,3$ ppm.
- La corrélation du H-6' avec le carbone C-6' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 123,2$ ppm.
- La corrélation du H-5' avec le carbone C-5' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 116,4$ ppm.
- La corrélation du H-8' avec le carbone C-8' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 114,3$ ppm.
- La corrélation du H-3 avec le carbone C-3 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 73,3$ ppm.
- La corrélation du H-2 avec le carbone C-2 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta = 70$ ppm.
- Les protons à $\delta = 3,8$ ppm permettent l'attribution du signal à $\delta = 52,5$ ppm au groupement OMe.

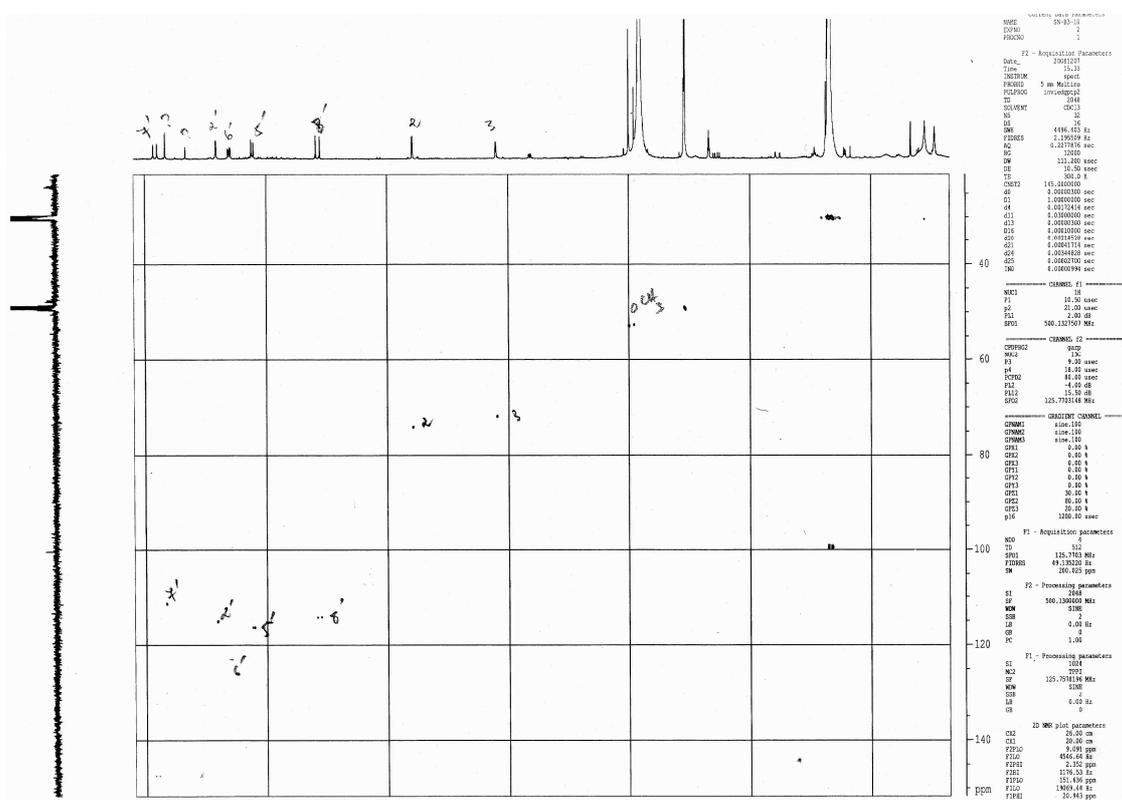


Figure-92 : Spectre HSQC (500MHz, CD₃OD) du produit B₃-10.

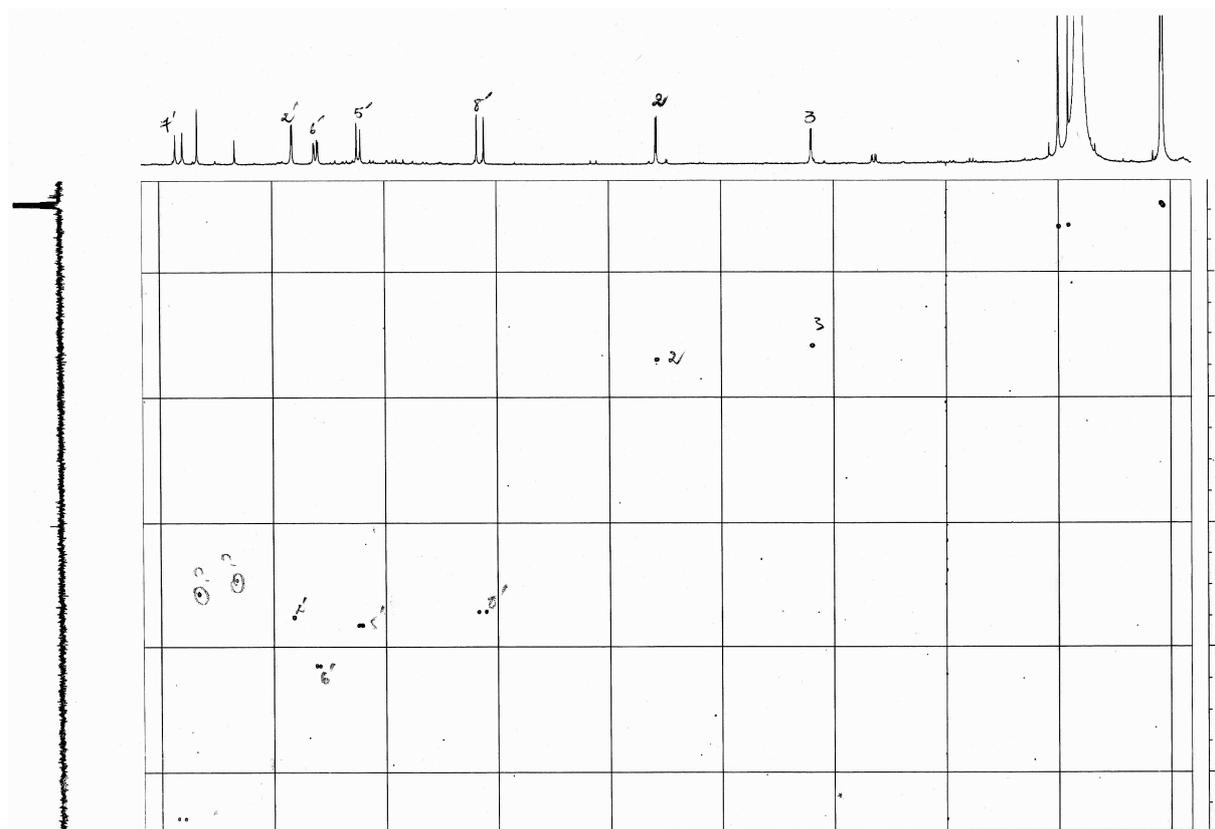


Figure-93 : Etallement du spectre HSQC du produit B₃₋₁₀.

La mesure du spectre HMBC (figure-94 et 95) observé à longue distance a montré les corrélations suivantes :

- Une corrélation entre le proton H-7' et les atomes de carbone à $\delta = 114,3$, $123,3$ et $166,9$ ppm attribuables aux carbones C-8', C-6' et C-9' respectivement.
- Des corrélations entre le proton H-2' et les atomes de carbone à $\delta = 146,7$ et $149,7$ ppm lesquels sont corrélés aussi au proton H-5'. Ces signaux sont donc attribuables aux carbones C-4' et C-3'. Le proton H-5' montre une autre tâche de corrélation avec l'atome de carbone à $\delta = 128,0$ ppm attribuable au carbone C-1'.
- Deux corrélations entre le H-8' et les atomes de carbones à $\delta = 128,0$ et $166,9$ ppm attribuables aux carbones C-1' et C-9' respectivement.
- Une tâche de corrélation entre le groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,8$ ppm ($\delta_C = 52,5$ ppm) et l'atome de carbone à $\delta = 166,9$ ppm attribuable au carbone C-4.

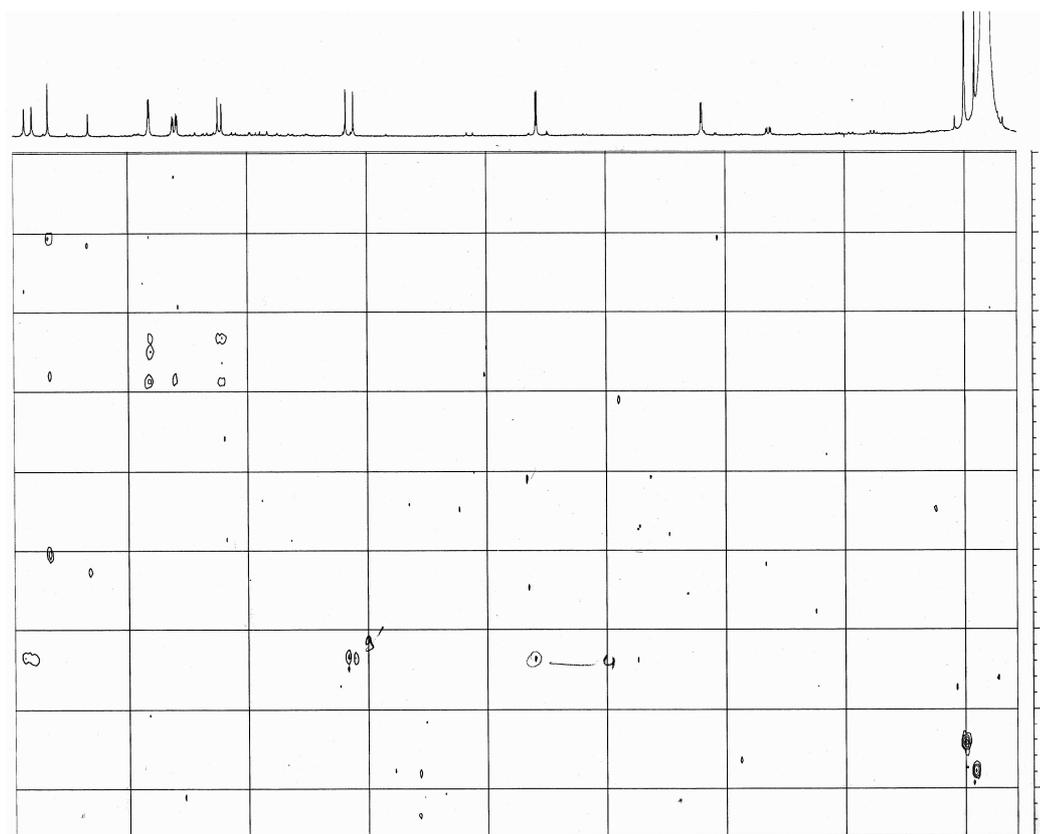


Figure-94 : spectre HMBC (500MHz, CD₃OD) du produit B₃₋₁₀.

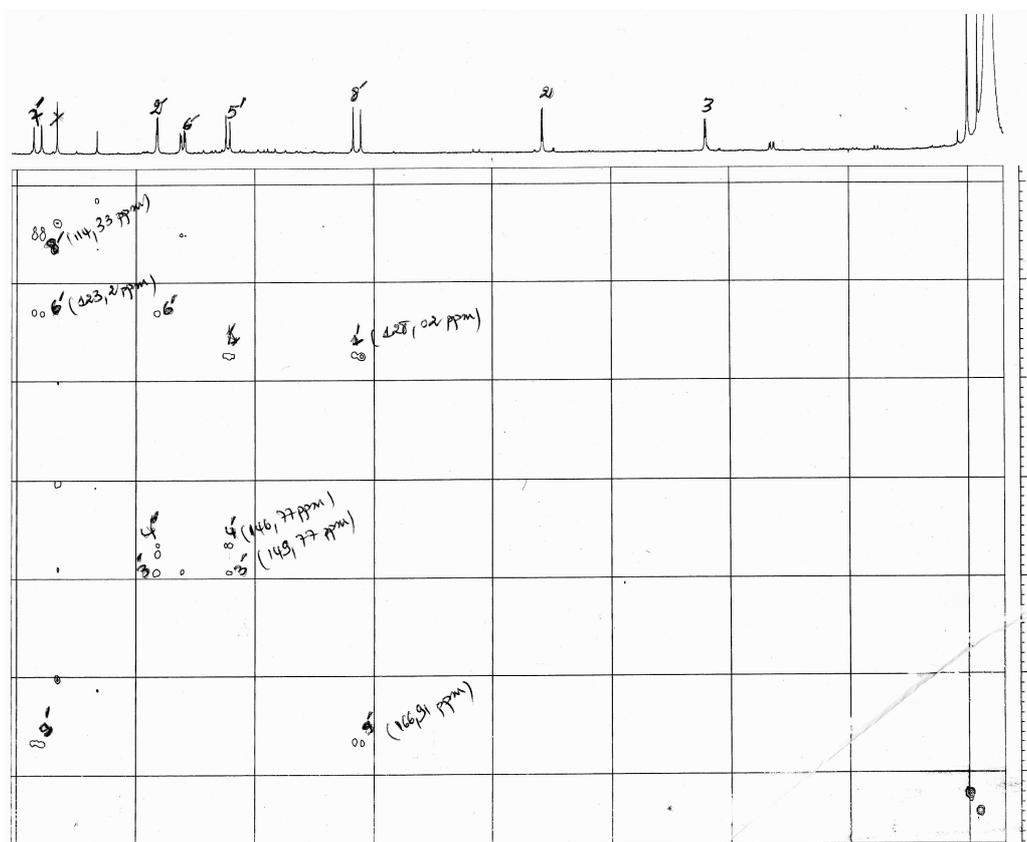


Figure-95 : Etalement du spectre HMB du produit B₃₋₁₀.

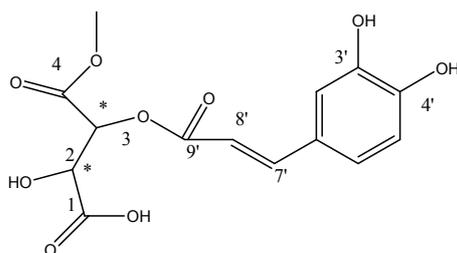
Les résultats des spectres RMN-HSQC et HMBC nous ont permis d'attribuer les différents déplacements chimiques des atomes de carbones du composé B₃₋₁₀. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau-71.

Tableau-71: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé B₃₋₁₀.

Carbone	Déplacements chimiques
1	173,18
2	73,37
3	70
4	166,91
1'	128,02
2'	115,39
3'	146,77
4'	149,77
5'	116,47
6'	123,2
7'	148,06
8'	114,33
9'	166,91
OMe	52,52

* : le spectre est enregistré dans le CD₃OD.

L'ensemble des données spectroscopiques et analytiques nous permettent d'identifier le composé B₃₋₁₀ comme étant l'acide 4-methoxy monocaffeoyl tartarique. Le pouvoir rotatoire de ce composé est mesuré à l'aide d'un polarimètre Perkin Elmer 241. Ce pouvoir est $[\alpha]_D = -188$. Ceci nous mène à confirmer la structure de ce composé. Il s'agit de l'acide 4-methoxy-monocaffeoyl-(2R,3R)-tartarique (monométhyle ester de l'acide caftarique). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Budzianowski 1993 et Sumaryono et al 1991. Ce composé est isolé pour la première fois de la propolis.



Acide 4-methoxy-monocaffeoyl-(2R,3R)-tartarique (monométhyle ester de l'acide tartarique).

V-3-1-4-Elucidation structural du composé B₃₋₁₂:

Le spectre RMN-¹H (figure-95 et 96, tableau-72) du composé B₃₋₁₂ enregistré dans le CD₃OD+CF₃COOD à 500MHz est comparable à celui des composés B₃₋₄ et B₃₋₁₀. Ce spectre montre les signaux relatifs au groupement trans-caffeoyl. Ces signaux apparaissent comme suit :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta = 7,65$ et $8,9$ ppm avec une même constante de couplage : ($J = 15,8$ Hz) attribuables aux protons H-8', H-8'', H-7' et H-7'' respectivement. Ces signaux suggèrent la présence de deux groupements trans-caffeoyl.
- Un doublet d'intégration 2 H à $\delta = 8,5$ ppm ($J = 1,9$ Hz) attribuable aux protons H-2' et H-2''.
- Un doublet dédoublé d'intégration 2 H à $\delta = 8,45$ ppm ($J = 8,2$ et $1,9$ Hz) attribuable aux protons H-6' et H-6''.
- Un doublet d'intégration 2H à $\delta = 8,2$ ppm ($J = 8,2$ Hz) attribuable aux protons H-5' et H-5''.

L'ensemble des signaux du noyau aromatique confirme la présence des deux groupements trans-caffeoyl. Le spectre montre aussi un singulet d'intégration 2H à $\delta = 7,15$ ppm caractéristiques des protons méthines oxygénés attribuables aux protons H-2 et H-3. Ces protons sont donc équivalents ce qui suggère que ce composé est symétrique. Ces résultats laissent supposé que les deux groupements trans-caffeoyl soient liés aux hydroxyles en position 2 et 3 de l'acide tartarique.

Les données RMN-¹H du composé B₃₋₁₂ sont représentées dans le tableau-72.

Tableau-72: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit B₃₋₁₂.

δ ppm	intégration	Multiplicité	Constante de couplage	Attribution
8,9	2H	d	15,8	H-7' et H-7''
8,5	2H	d	1,9	H-2' et H-2''
8,45	2H	dd	8,2 et 1,9	H-6' et H-6''
8,2	2H	d	8,2	H-5' et H-5''
7,65	2H	d	15,8	H-8' et H-8''
7,15	2H	s	-	H-2 et H-3

* : spectre enregistré dans le CD₃OD + CF₃COOD.

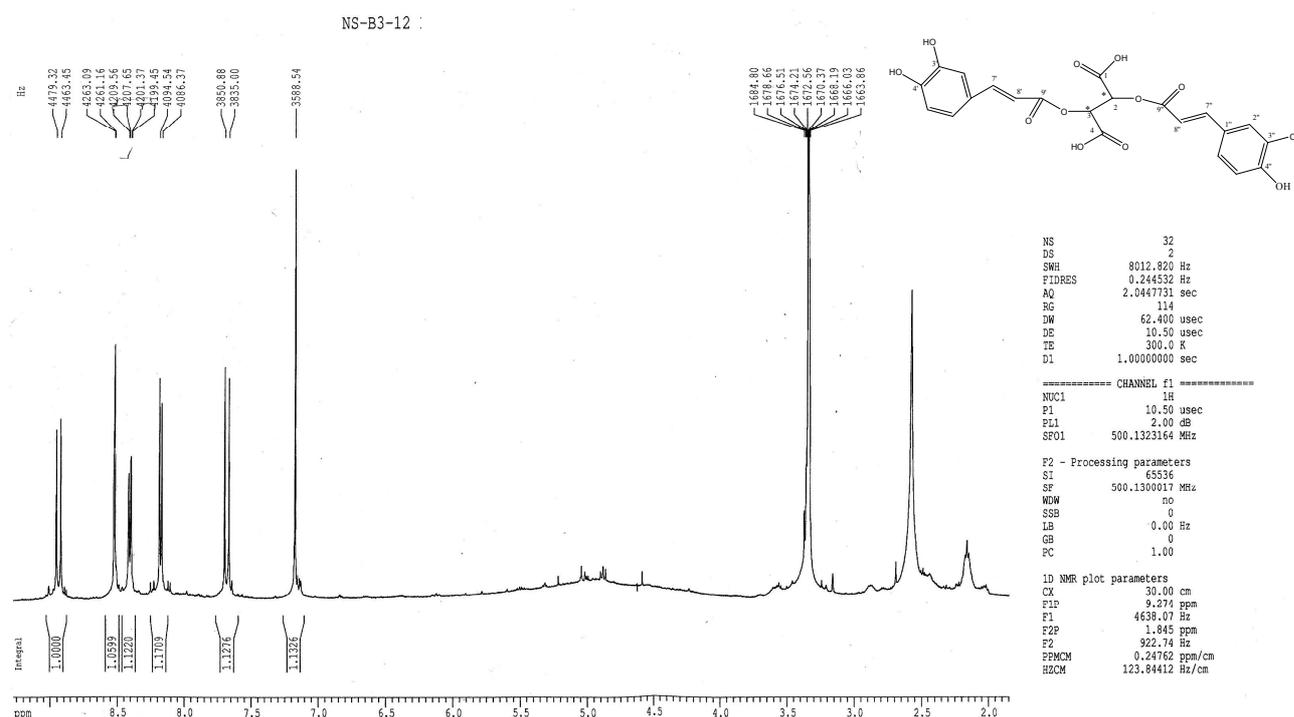


Figure-96 : Spectre RMN-H¹ (500MHz, CD₃OD + CF₃COOD, δ ppm) du produit B₃₋₁₂.

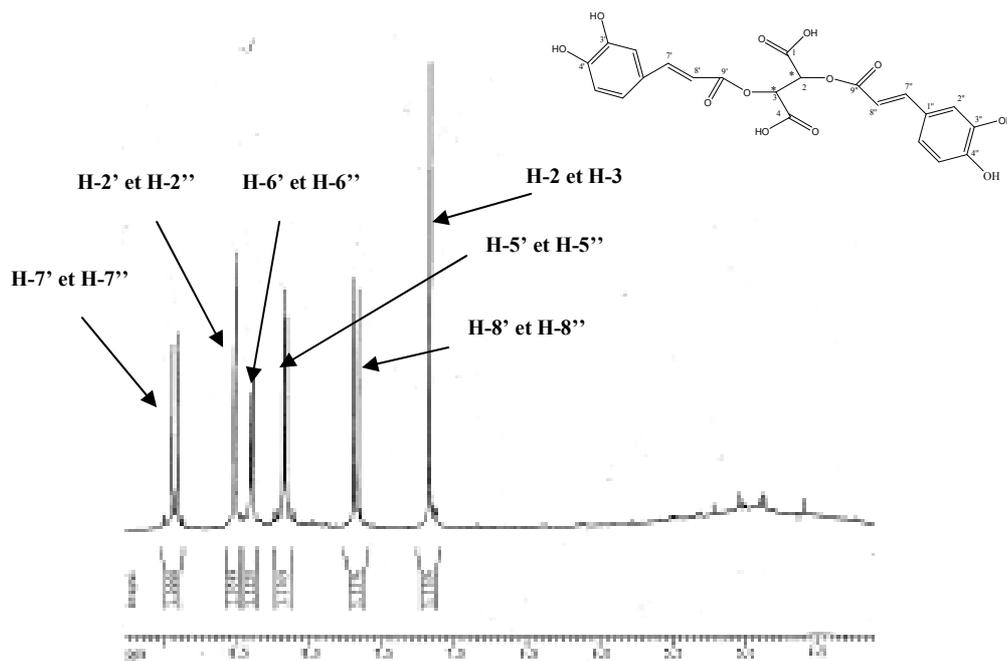


Figure-97 : Etallement du spectre RMN-H¹ du produit B₃₋₁₂.

Le spectre de masse en impact électronique (figure 98 et 99, tableau-73) présente deux pics à $m/z = 150$ et $m/z = 180$ caractéristiques des fragments $[C_4H_6O_6]^+$ et $[C_9H_8O_4]^+$. Ces fragments correspondent à l'acide tartarique et à l'acide caféique respectivement. Le spectre présente aussi un pic à $m/z = 294$ correspondant au fragment $[M-C_9H_8O_4+H]^+$. Ce fragment est issu de la perte d'un groupement trans-caffeoyl (Ilorach *et al* 2008, Veit *et al* 1991). Ces résultats nous orientent vers la structure : acide di-caffeoyl-tartarique de formule brut $C_{22}H_{18}O_{12}$.

Tableau-73: Fragmentation du produit B₃₋₁₂.

Pics fragments	m/z	%
$[M]^+$	474	-
$[M-C_9H_8O_4+H]^+$	295	26
$[C_9H_8O_4]^+$	180	33
$[C_4H_6O_6]^+$	150	100

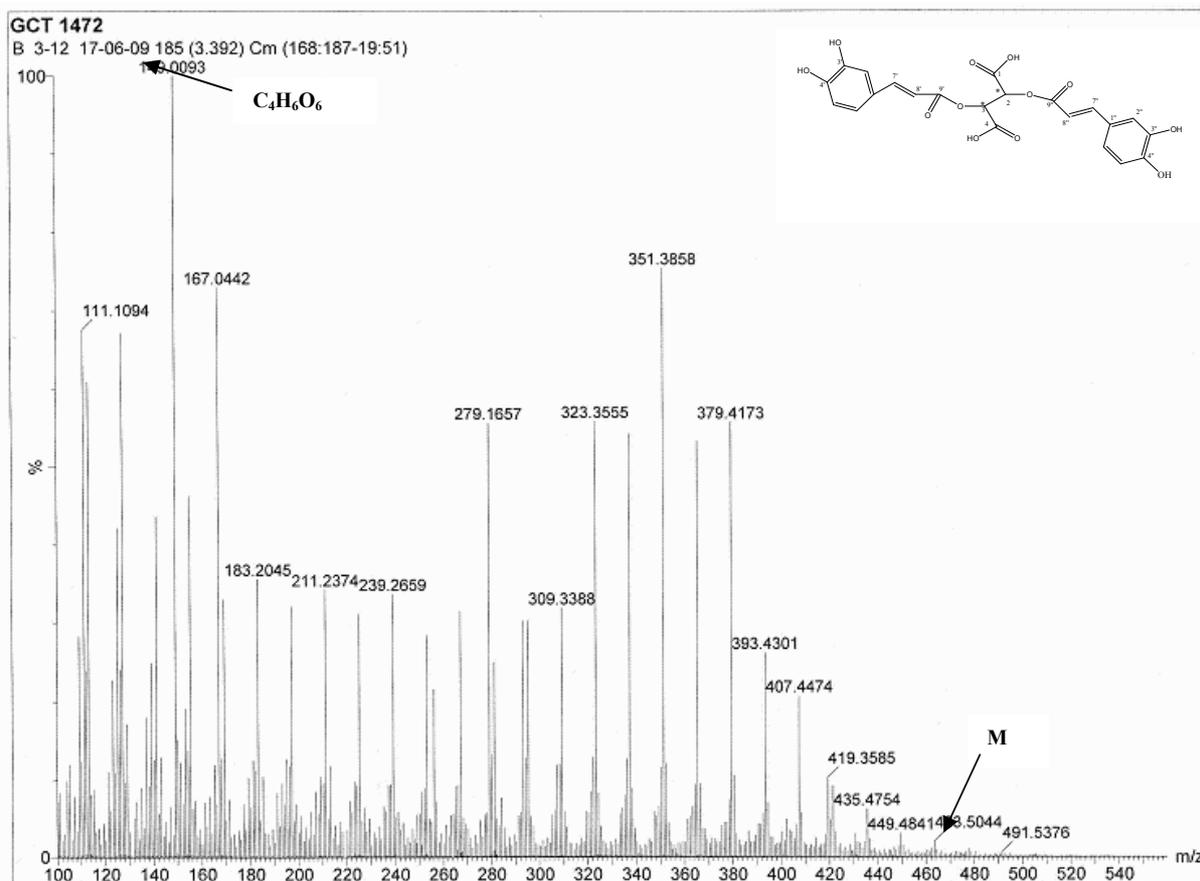


Figure-98 : Spectre EI-MS du produit B₃₋₁₂.

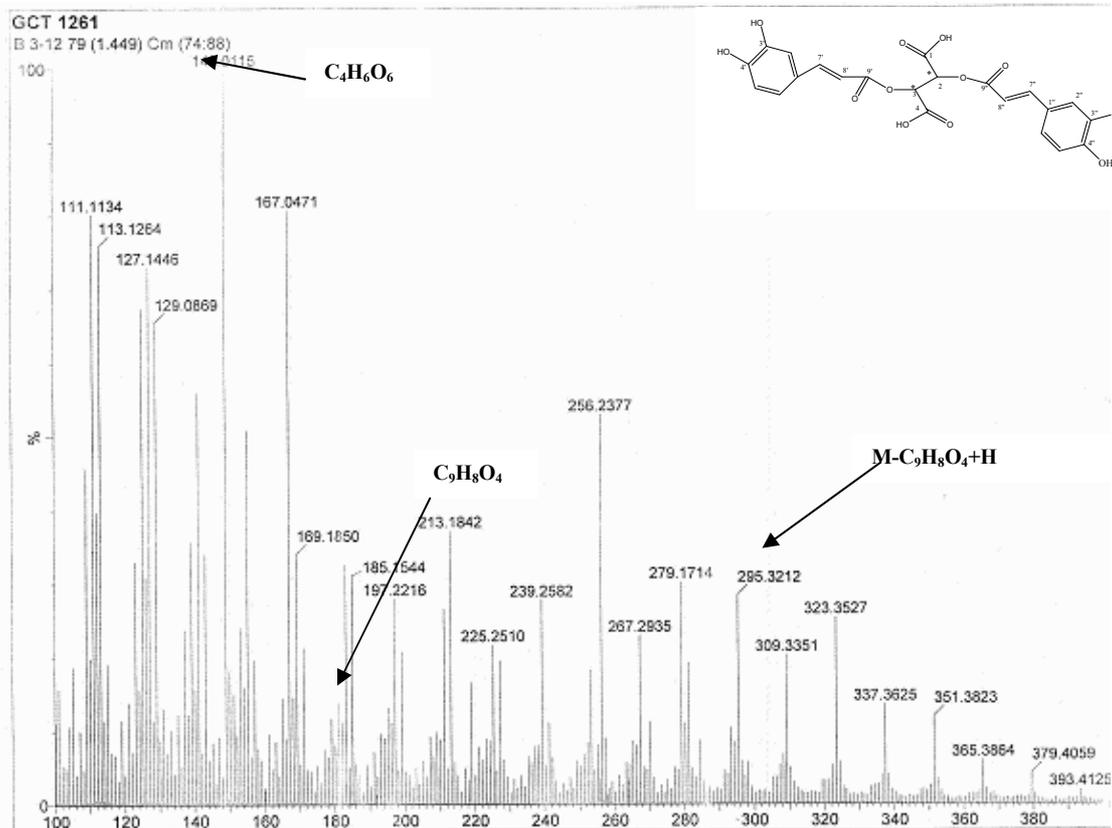


Figure-99 : Etalement du spectre EI-MS du produit B₃₋₁₂.

Le spectre COSY (figure-100) montre que les protons H-7' et H-7'' à $\delta = 8,9$ ppm corrélient avec les protons H-8' et H-8'' à $\delta = 7,65$ ppm et que les protons H-6' et H-6'' à $\delta = 8,45$ ppm corrélient avec les protons H-5' et H-5'' et avec les protons H-2' et H-2'' à $\delta = 8,2$ ppm et à $\delta = 8,5$ ppm respectivement.

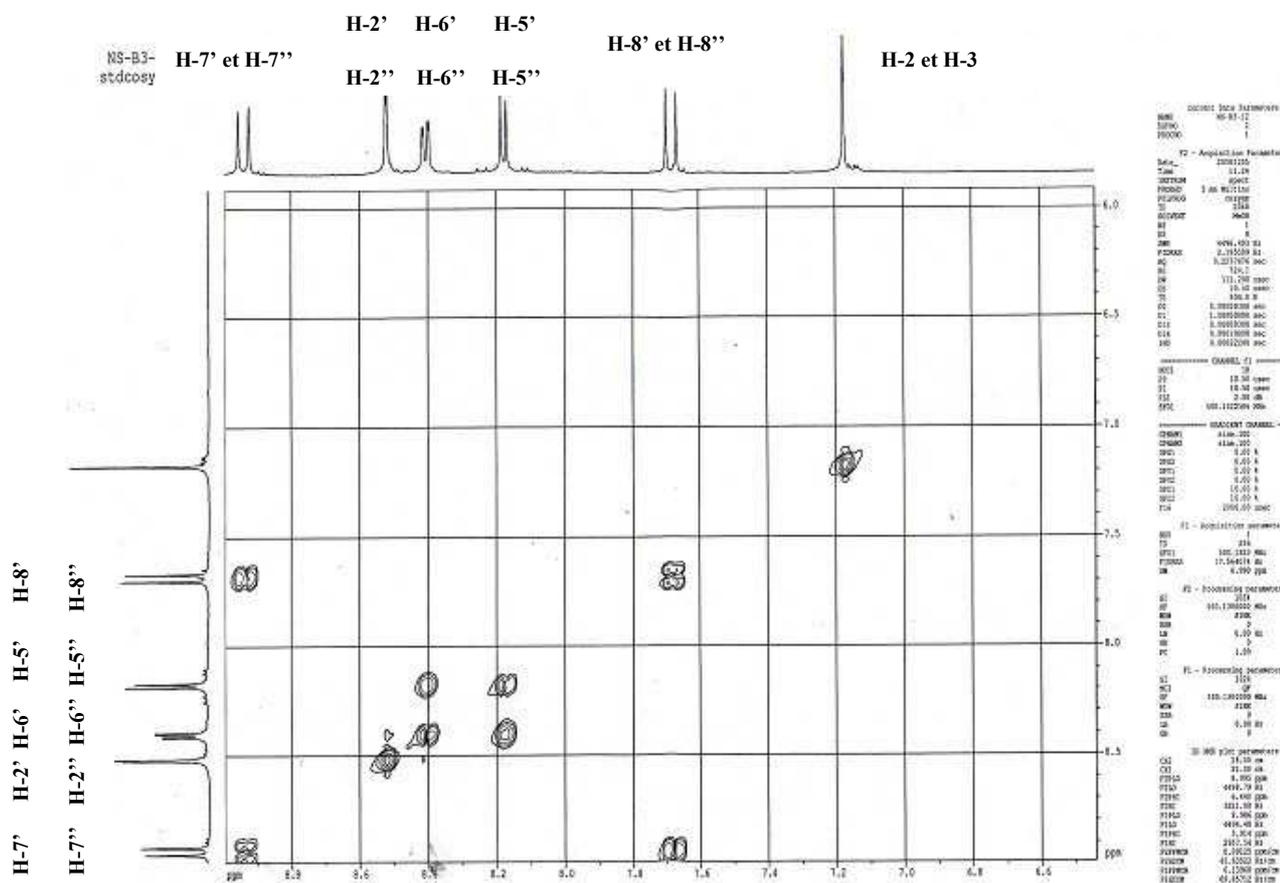


Figure-100 : Spectre COSY (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B 3-12.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure-101) permet l'attribution des signaux des atomes de carbones correspondants comme suit:

- La corrélation des protons H-2 et H-3 avec les carbones C-2 et C-3 montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 72$ ppm.
- La corrélation des protons H-8' et H-8'' avec les carbones C-8' et C-8'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 114,2$ ppm.
- La corrélation des protons H-5' et H-5'' avec les carbones C-5' et C-5'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 116,8$ ppm.
- La corrélation des protons H-6' et H-6'' avec les carbones C-6' et C-6'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 123,3$ ppm.
- La corrélation des protons H-2' et H-2'' avec les carbones C-2' et C-2'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 115,8$ ppm.

- La corrélation des protons H-7' et H-7'' avec les carbones C-7' et C-7'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 148$ ppm.

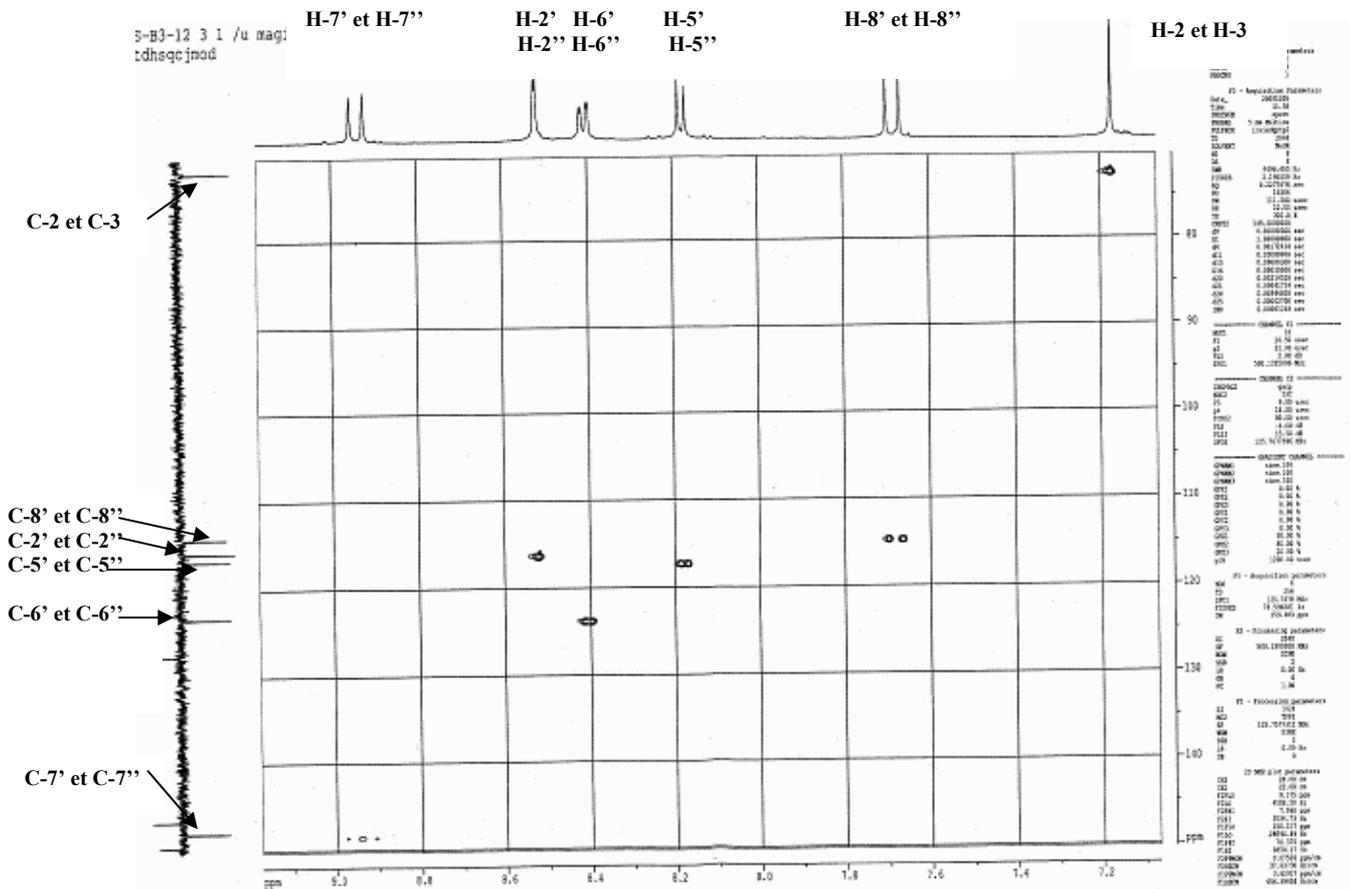


Figure-101 : Spectre HSQC (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B₃₋₁₂.

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure-102 et 103) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

- Les protons H-2 et H-3 montrent deux tâches de corrélation avec le même atome de carbone à $\delta = 168,9$ ppm attribuable aux carbones C-1 et C-4. Ces carbones correspondent aux fonctions carboxyliques de l'acide tartarique.
- Les protons H-8' et H-8'' corrélient avec deux atomes de carbone à $\delta = 127,6$ ppm attribuables aux carbones C-1' et C-1'' et deux autres atomes de carbone à $\delta = 166,7$ ppm attribuables aux carbones C-9' et C-9''.
- Les protons H-5' et H-5'' montrent trois tâches de corrélation :
-la première avec deux atomes de carbone à $\delta = 127,6$ ppm attribuables aux carbones C-1' et C-1''.

-la deuxième avec deux autres atomes de carbone à $\delta = 146,7$ ppm attribuables aux carbones C-3' et C-3''.

-la troisième avec deux atomes de carbone à $\delta = 149,6$ ppm attribuables aux carbones C-4' et C-4''.

- Les protons H-6' et H-6'' montrent deux tâches de corrélation avec les atomes de carbone à $\delta = 116,8$ ppm et à $\delta = 148$ ppm et à $\delta = 146,7$ ppm attribuables aux carbones C-5' et C-5'' et aux carbones C-7' et C-7'' respectivement.
- Les protons H-2' et H-2'' montrent trois tâches de corrélation avec les atomes de carbone à $\delta = 123,3$ ppm, à $\delta = 149,6$ ppm et à $\delta = 146,7$ ppm attribuables aux carbones C-6' et C-6'', aux carbones C-4' et C-4'' et aux carbones C-3' et C-3'' respectivement.
- Les protons H-7' et H-7'' montrent trois tâches de corrélation :
 - la première avec deux atomes de carbone à $\delta = 115,8$ ppm attribuables aux carbones C-2' et C-2''.
 - la deuxième avec deux autres atomes de carbone à $\delta = 123,3$ ppm attribuables aux carbones C-6' et C-6''.
 - la troisième avec deux autres atomes de carbone à $\delta = 166,7$ ppm attribuables aux carbones C-9' et C-9''.

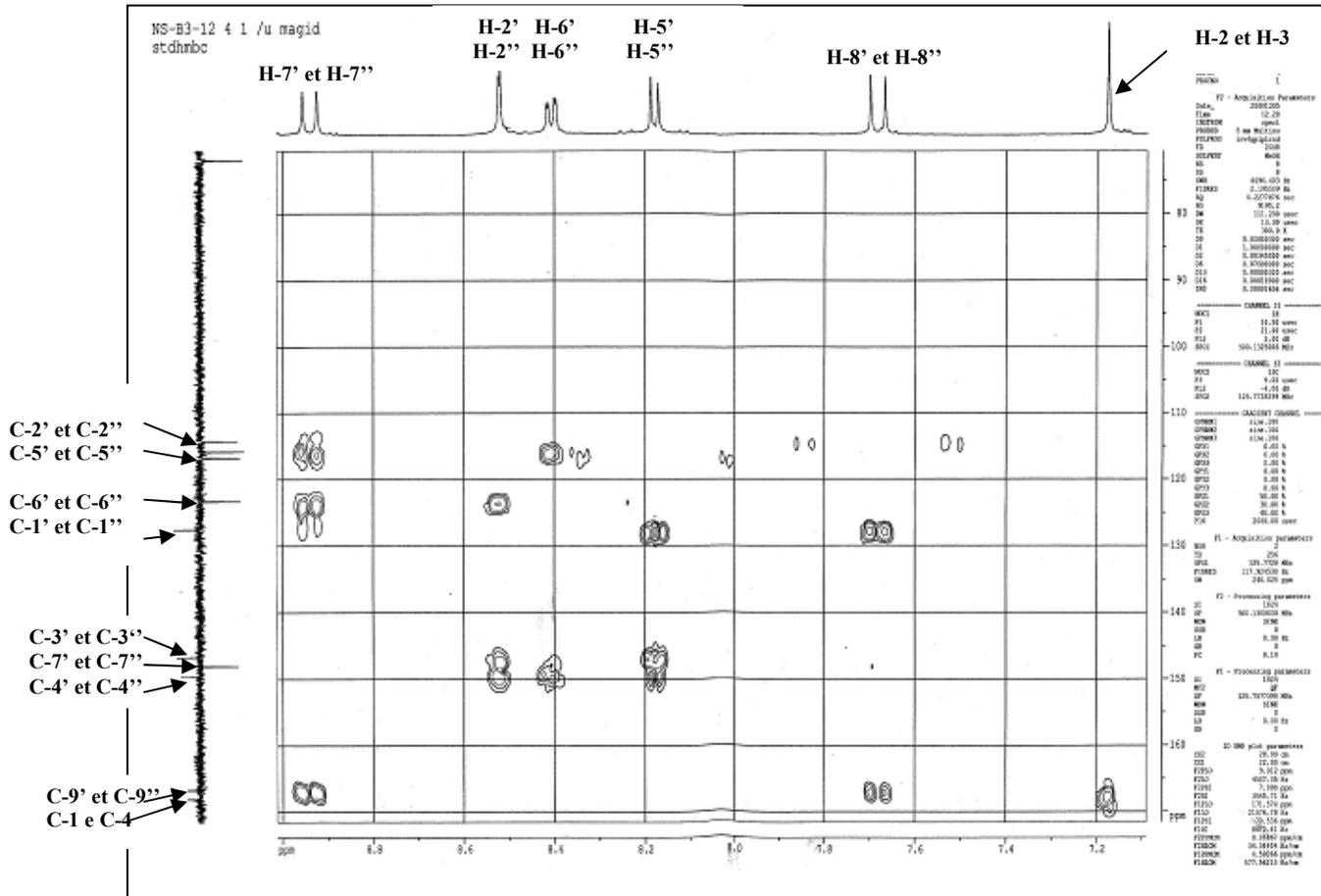


Figure-102 : Spectre HMBC (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B 3-12.

-B3-12 4 1 /u rigid
dhmbc

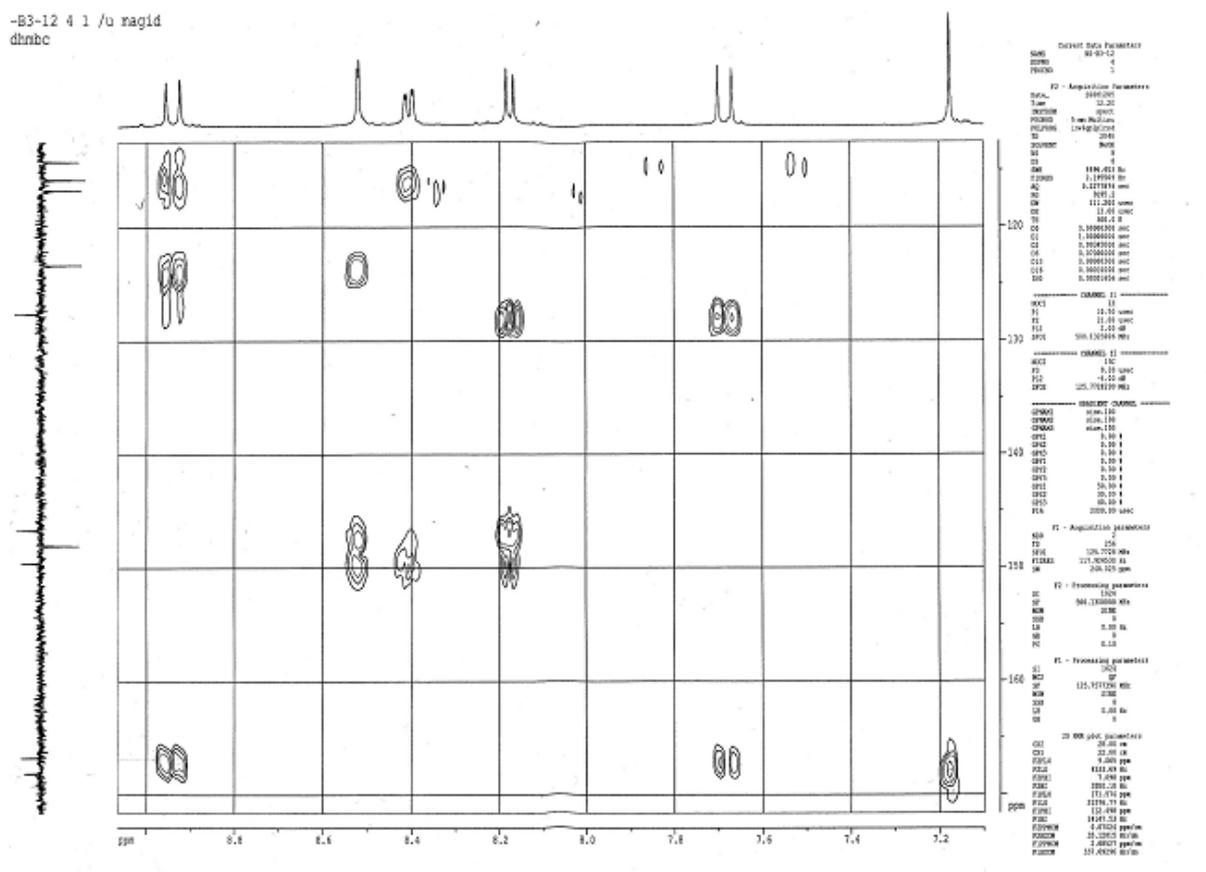


Figure-103 : Etalement du spectre HMBC (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B₃.

12.

La combinaison des données de la RMN-HSQC et HMBC avec le spectre J-modulé (figure-104) du composé B₃₋₁₂ nous ont permis d'attribuer les différents déplacements chimiques des atomes de carbone. Ces résultats sont représentés dans le tableau-74.

Tableau-74: Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du composé B₃₋₁₂.

Carbone	Déplacements chimiques
1,4	168,1
2,3	72
1',1''	127,6
2',2''	115,8
3',3''	146,7
4',4''	149,6
5',5''	116,8
6',6''	123,3
7',7''	148
8',8''	114,2
9',9''	166,7

* : le spectre est enregistré dans le CD₃OD+CF₃COOD.

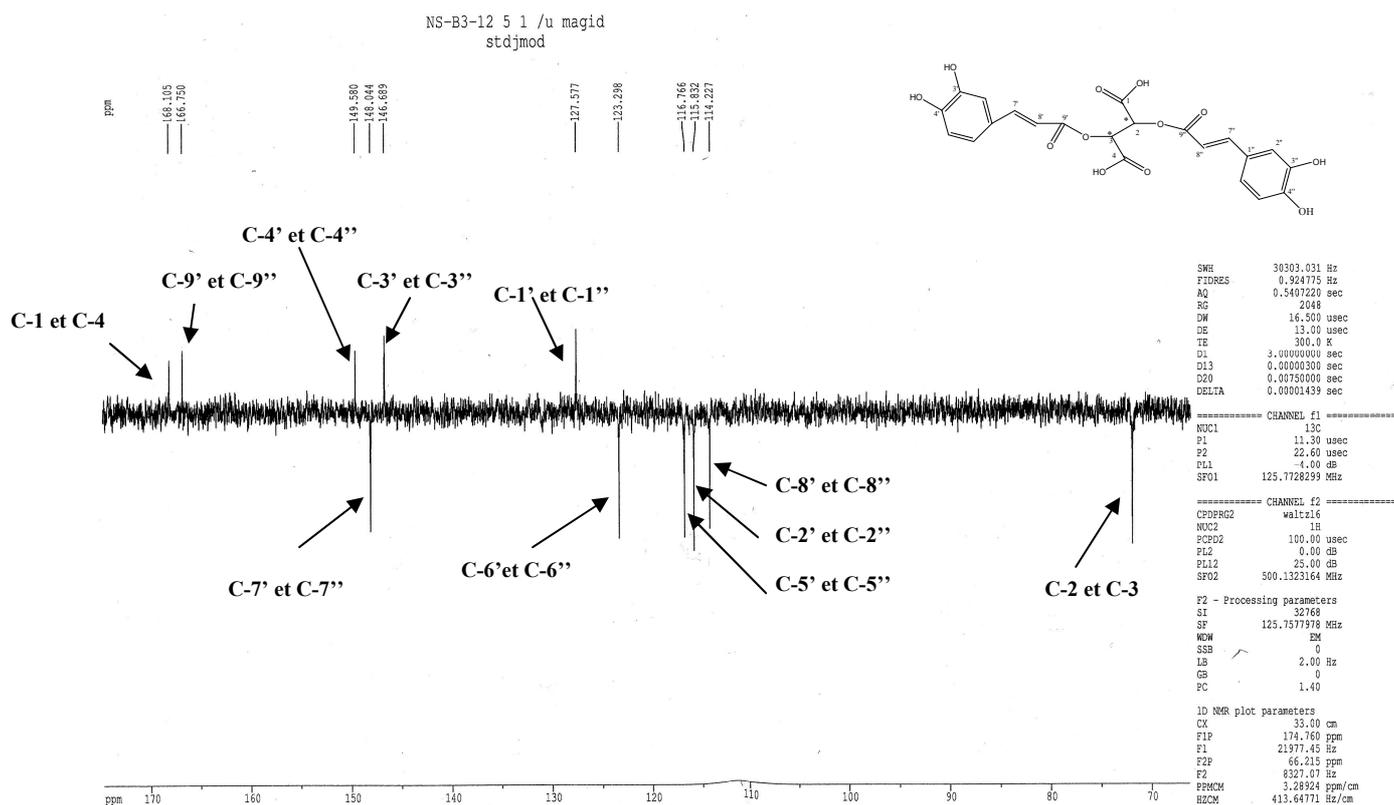
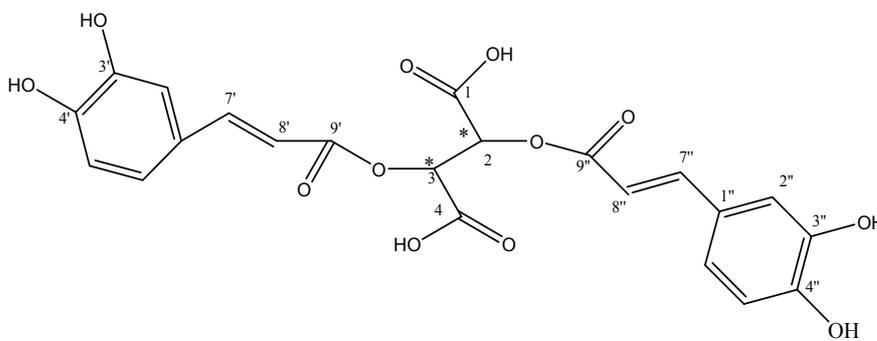


Figure-104 : Spectre J-modulé (125MHz, CD₃OD+CF₃COOD, δ ppm) du produit B₃₋₁₂.

L'ensemble des données spectroscopiques et analytiques nous permettent d'identifier le composé B₃₋₁₂ comme étant l'acide di-caffeoyl tartarique. Afin de déterminer la stéréochimie de ce composé, son pouvoir rotatoire est mesuré à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241. Le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = +92$. La structure de ce composé est donc acide di-E-caffeoyl-(2S,3S)-tartarique (acide chicorique). Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Veit *et al* 1991, Scarpati *et al* 1958, Cheminat *et al* 1988, Hasegara *et al* 1973). Ce composé est isolé pour la première fois de la propolis.



Acide di-E-caffeoyl-(2S,3S)-tartarique (acide chicorique)

V-3-1-5-Elucidation structurale du composé B₃₋₁₅ :

Le spectre RMN-¹H du composé B₃₋₁₅ enregistré dans le CD₃OD+ CF₃COOD à 500MHz est comparable à celui du composé B₃₋₁₂ à une exception près, celle-ci est due à la présence d'un groupement méthoxyle qui apparait sous forme d'un singulet d'intégration 3H à $\delta = 5,05$ ppm.

Le spectre proton du composé B₃₋₁₅ (figure-105 et 106, tableau-75) montre les signaux suivants :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,15$ et $7,10$ ppm avec une même constante de couplage : ($J = 2,9$ Hz) caractéristiques des protons méthines oxygénés attribuables aux protons H-2 et H-3 respectivement.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,69$ et $7,66$ ppm avec une même constante de couplage : ($J = 15,9$ Hz) attribuables aux protons H-8' et H-8'' respectivement.
- Un doublet d'intégration 2H à $\delta = 8,15$ ppm ($J = 8,2$ Hz) attribuable aux protons H-5' et H-5''.
- Un doublet dédoublé d'intégration 2H à $\delta = 8,40$ ppm ($J = 8,2$ et $1,9$ Hz) attribuable aux protons H-6' et H-6''.
- Un multiplet d'intégration 2H à $\delta = 8,55$ ppm attribuable aux protons H-2' et H-2''.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 8,94$ et $8,93$ ppm avec une même constante de couplage : ($J = 15,9$ Hz) attribuables aux protons H-7' et H-7'' respectivement.

Les données RMN-¹H du composé B₃₋₁₀ sont représentées dans le tableau-70.

Tableau-75: Données RMN-H¹ (déplacements chimiques et constantes de couplage)* du produit B₃₋₁₅.

δ ppm	intégration	multiplicité	Constante de couplage	Attribution
7,10	1H	d	2,9	H-3
7,15	1H	d	2,9	H-2
7,66	1H	d	15,9	H-8''
7,69	1H	d	15,9	H-8'
8,15	2H	d	8,2	H-5' et H-5''
8,40	2H	dd	8,2 et 1,9	H-6' et H-6''
8,55	2H	m	-	H-2' et H-2''
8,93	1H	d	15,9	H-7''
8,94	1H	d	15,9	H-7'
5,05	3H	s	-	OMe

* : spectre enregistré dans le CD₃OD + CF₃COOD.

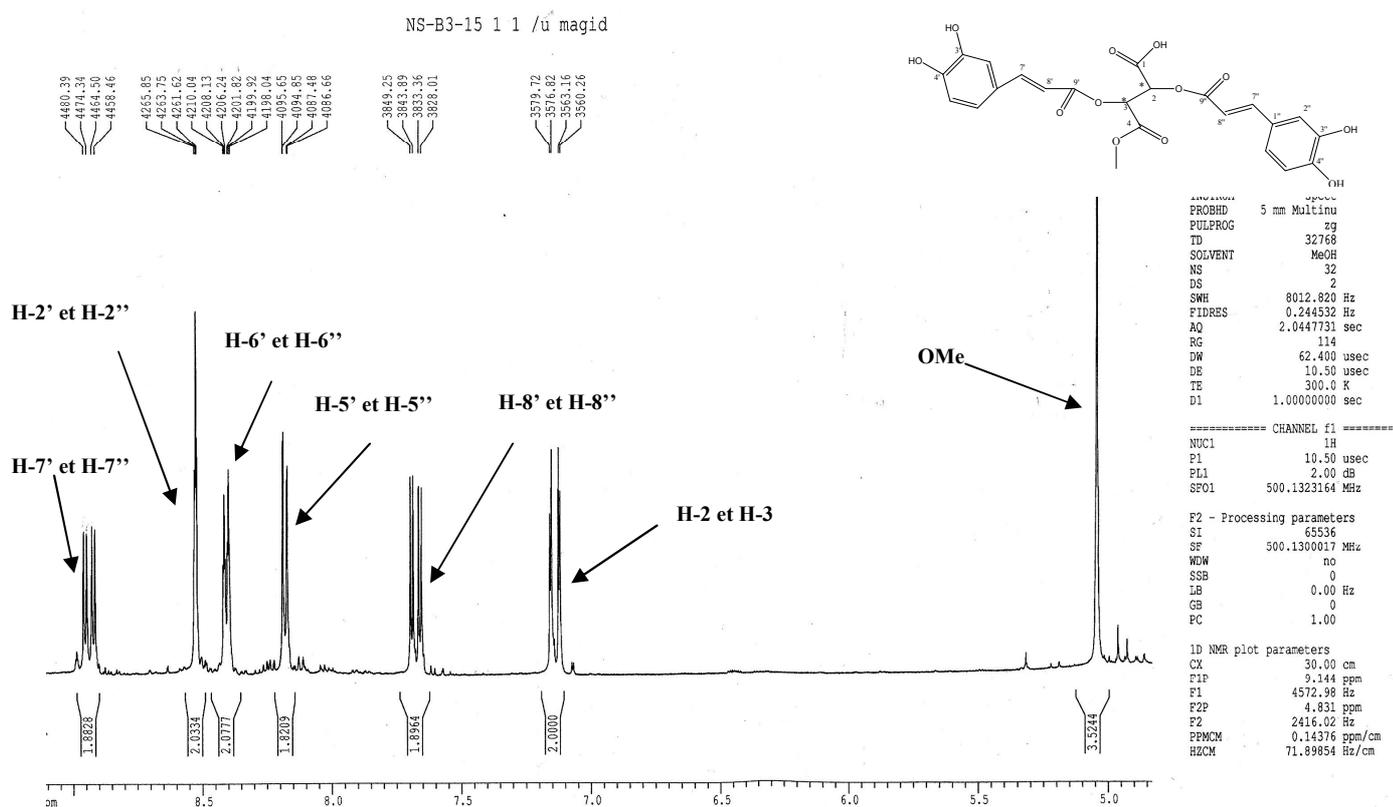


Figure-105 : Spectre RMN-H¹ (500MHz, CD₃OD + CF₃COOD, δ ppm) du produit B₃₋₁₅.

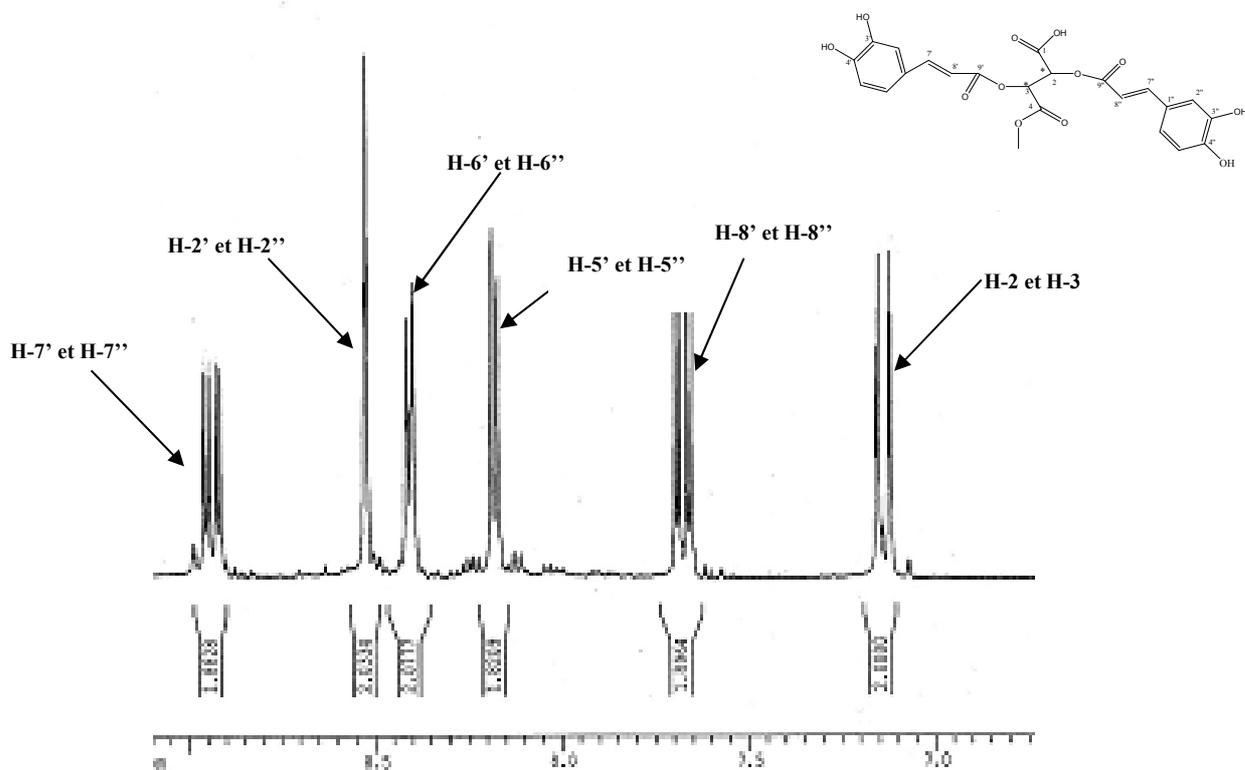


Figure-106 : Etallement du spectre RMN- H^1 (500MHz, $CD_3OD + CF_3COOD$, δ ppm) du produit B_{3-15} .

Le spectre de masse en impact électronique (figure-107) présente deux pics à $m/z = 150$ et $m/z = 180$ caractéristiques des fragments $[C_4H_6O_6]$ et $[C_9H_8O_4]$. Ces fragments correspondent à l'acide tartrique et à l'acide caféique respectivement. Le spectre présente aussi un pic à $m/z = 488$ correspondant au pic moléculaire du composé B_{3-15} de formule brut $C_{23}H_{20}O_{12}$.

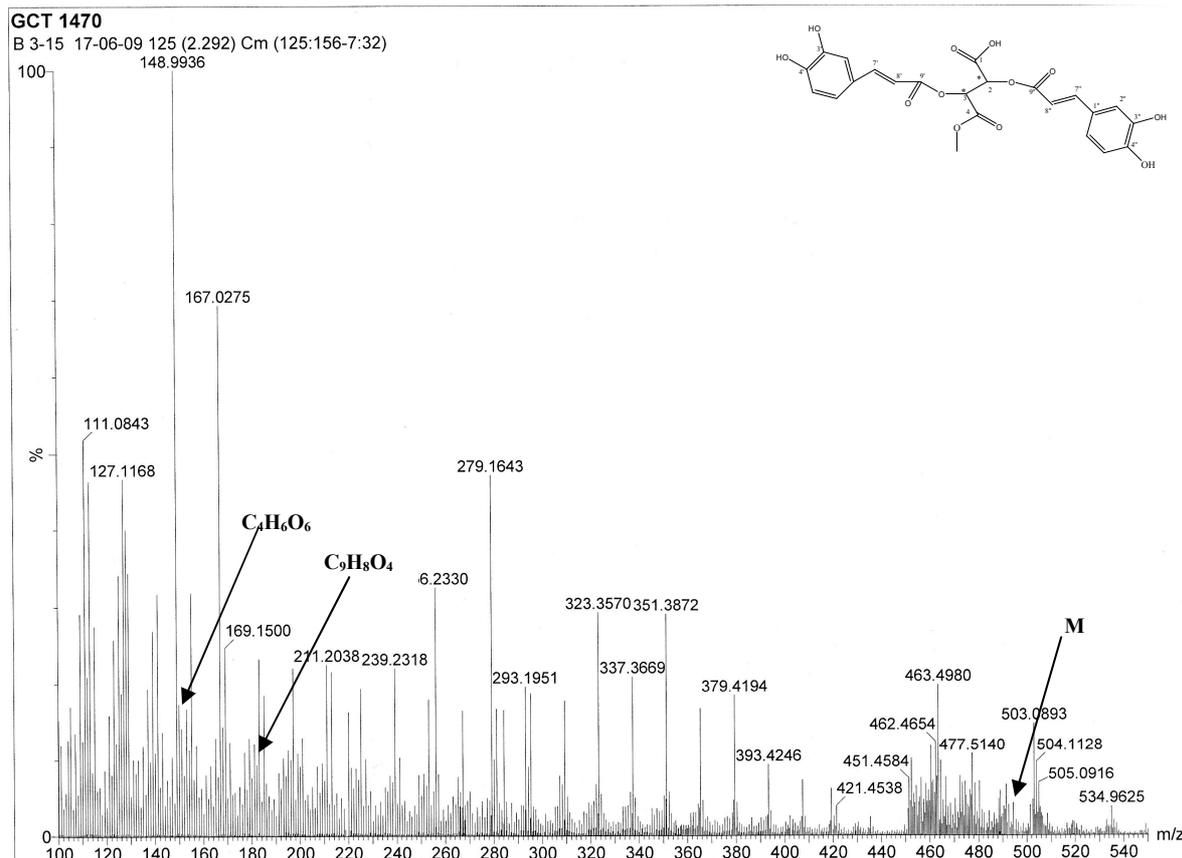


Figure-107 : Spectre EI-MS du produit B₃₋₁₅.

Le spectre COSY (figure-108) montre que les protons H-7' et H-7'' à $\delta = 8,94$ et $8,93$ ppm corrélient avec les protons H-8' et H-8'' à $\delta = 7,69$ et $7,66$ ppm et que les protons H-6' et H-6'' à $\delta = 8,40$ ppm corrélient avec les protons H-5' et H-5'' à $\delta = 8,15$ ppm et les protons H-2' et H-2'' à $\delta = 8,55$ ppm respectivement. Le spectre montre aussi que le proton H-2 à $\delta = 7,15$ ppm corrélie avec le proton H-3 à $\delta = 7,10$ ppm.

NS-B3-15 2 1 /u magid
stdcosy

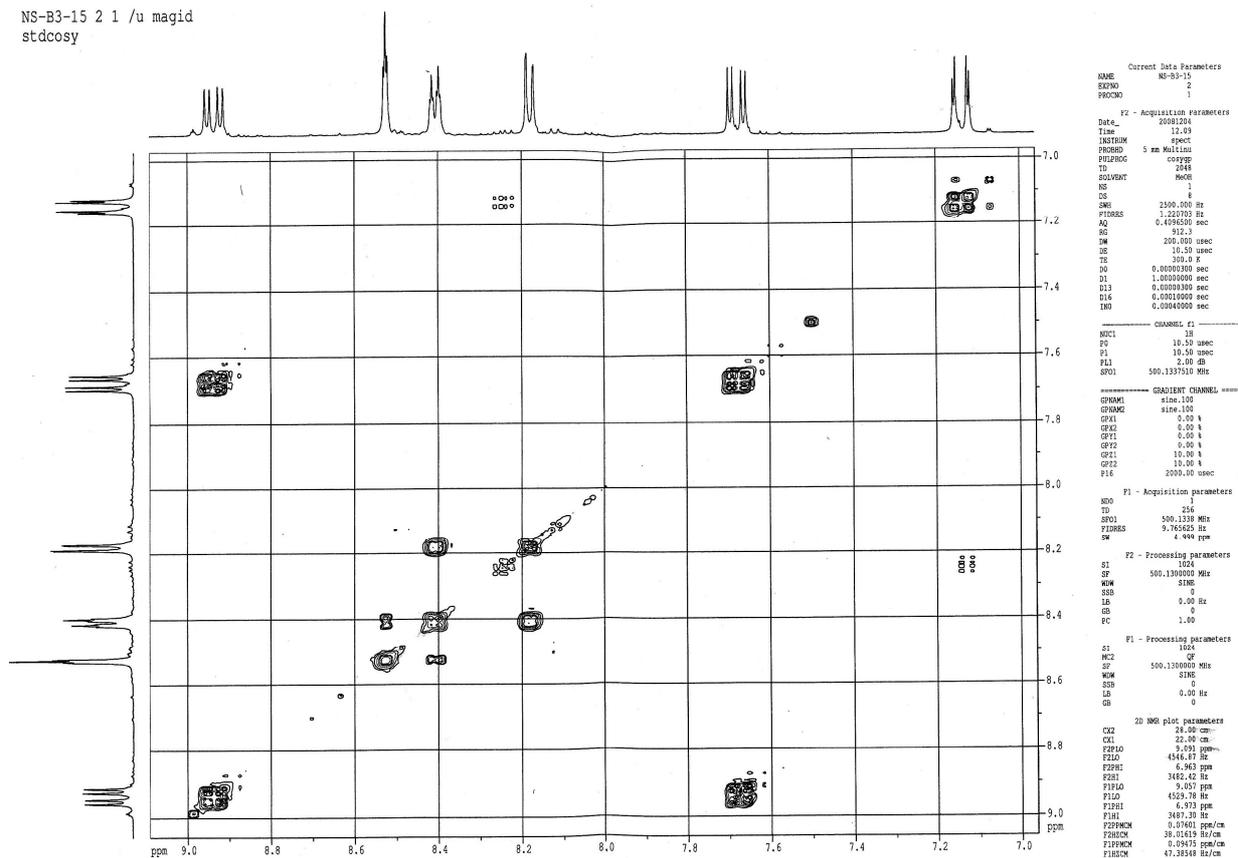


Figure-108 : Spectre COSY (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B₃₋₁₅.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure-109) permet l'attribution des signaux des atomes de carbone correspondants comme suit:

- La corrélation des protons H-7' et H-7'' avec les atomes de carbone C-7' et C-7'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 149,0$ ppm et $\delta = 150,1$ ppm.
- La corrélation des protons H-2' et H-2'' avec les atomes de carbone C-2' et C-2'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 117,7$ ppm.
- La corrélation des protons H-6' et H-6'' avec les atomes de carbone C-6' et C-6'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 125,1$ et $\delta = 125,2$ ppm.
- La corrélation des protons H-5' et H-5'' avec les atomes de carbone C-5' et C-5'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 118,6$ ppm.
- La corrélation des protons H-8' et H-8'' avec les atomes de carbone C-8' et C-8'' montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 115,8$ ppm et $\delta = 115,9$ ppm.
- La corrélation des protons H-2 et H-3 avec les atomes de carbone C-2 et C-3 montre que ces derniers ont un déplacement chimique $\delta = 74$ ppm et $\delta = 73,7$.

- Les protons à $\delta = 5,05$ ppm permettent l'attribution du signal à $\delta = 55,3$ ppm au groupement OMe.

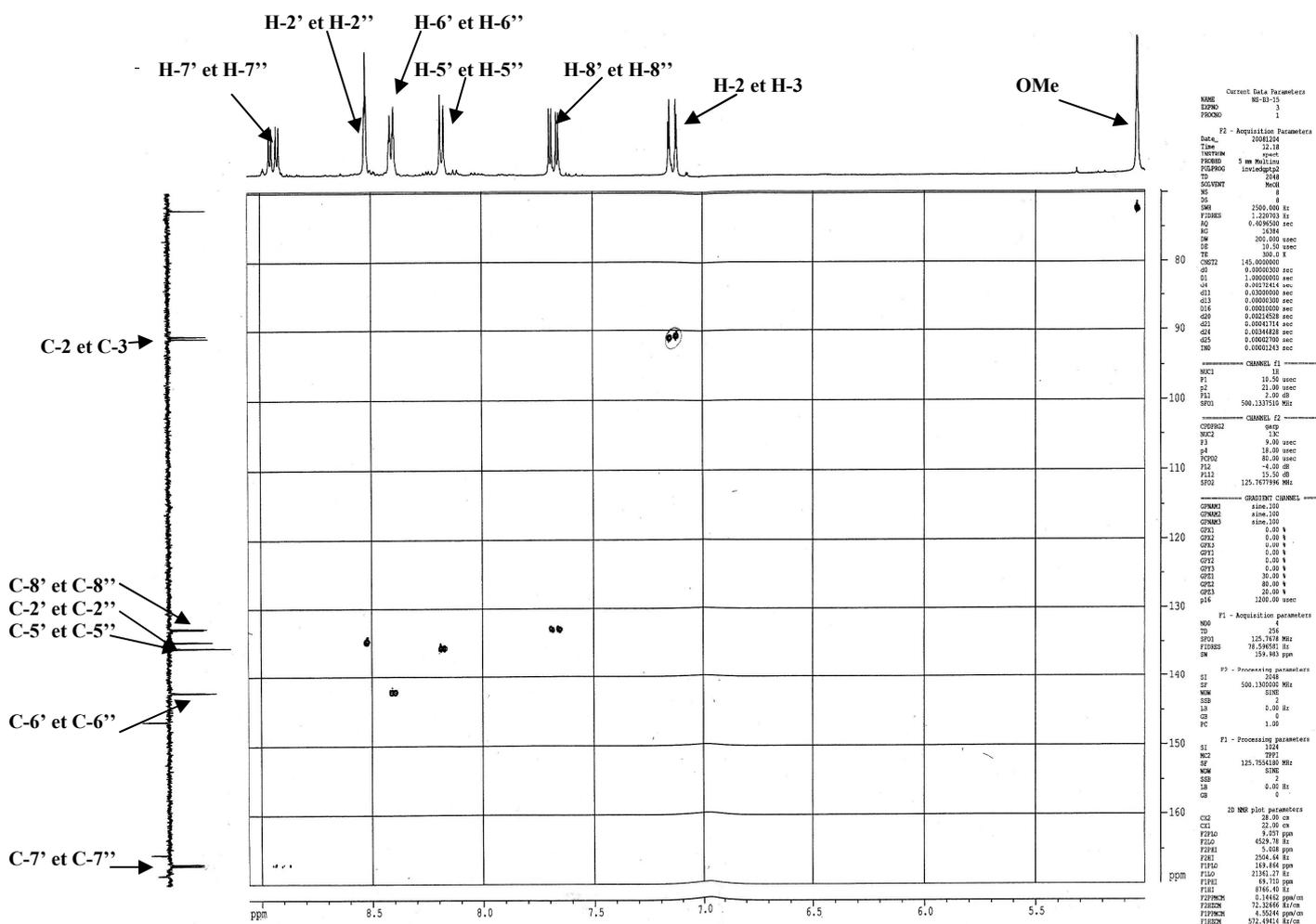


Figure-109 : Spectre HSQC (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B₃₋₁₅.

La mesure du spectre HMBC (figure-110, 111 et 112) observé à longue distance a montré les corrélations suivantes :

- Cinq corrélations entre les protons H-7' et H-7'' et les atomes de carbone à :
 - ✓ $\delta = 115,8$ ppm et $\delta = 115,9$ ppm attribuables aux carbones C-8' et C-8''.
 - ✓ $\delta = 117,7$ ppm attribuable aux carbones C-2' et C-2''.
 - ✓ $\delta = 125,1$ ppm et $\delta = 125,2$ ppm attribuables aux carbones C-6' et C-6''.
 - ✓ $\delta = 129,3$ ppm et $\delta = 119,4$ ppm attribuables aux carbones C-1' et C-1''.
 - ✓ $\delta = 168,5$ ppm et $\delta = 168,6$ ppm attribuables aux carbones C-9' et C-9''.
- Trois tâches de corrélation entre les protons H-2' et H-2'' et les atomes de carbone à
 - $\delta = 125,1$ ppm et $\delta = 125,2$ ppm attribuables aux carbones C-6' et C-6'', les atomes de carbone à $\delta = 148,5$ ppm attribuables aux carbones C-3' et C-3'' et les atomes de carbone à $\delta = 151,5$ ppm attribuables aux carbones C-4' et C-4''.

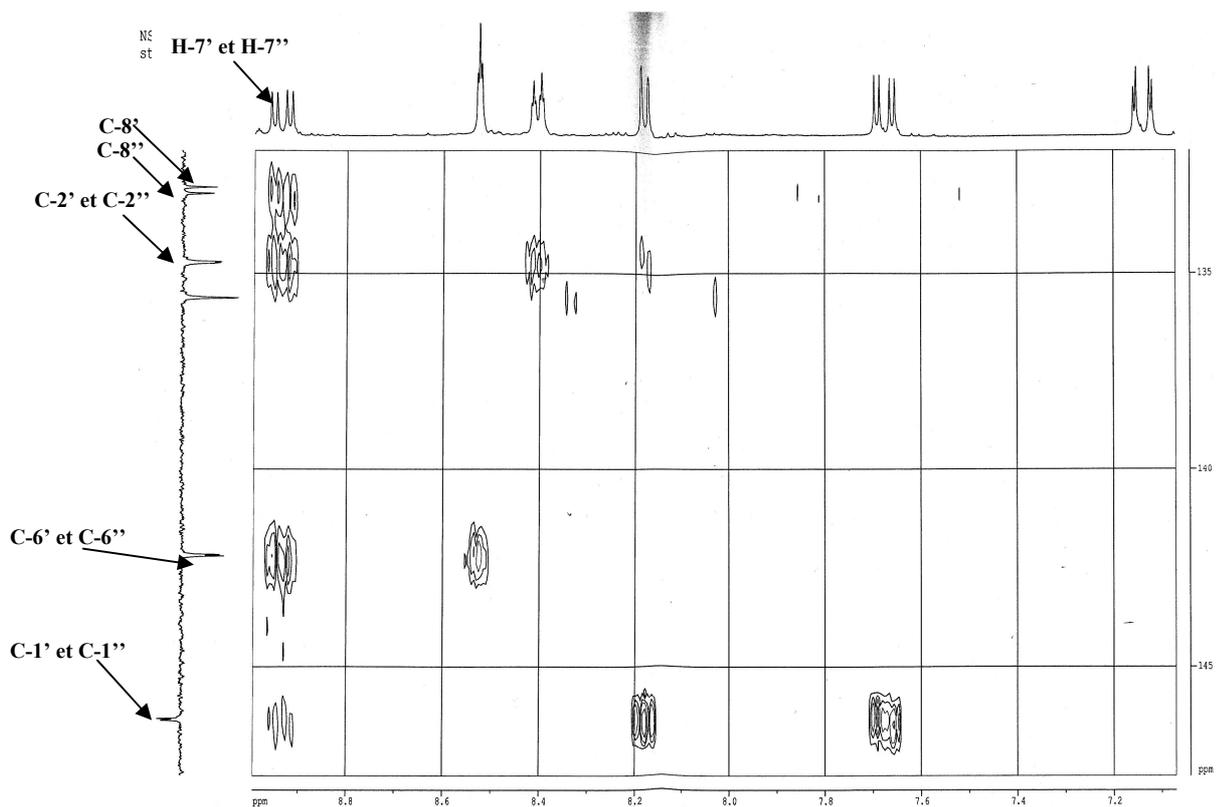


Figure-111: Etallement du spectre HMBC (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B₃₋₁₅.

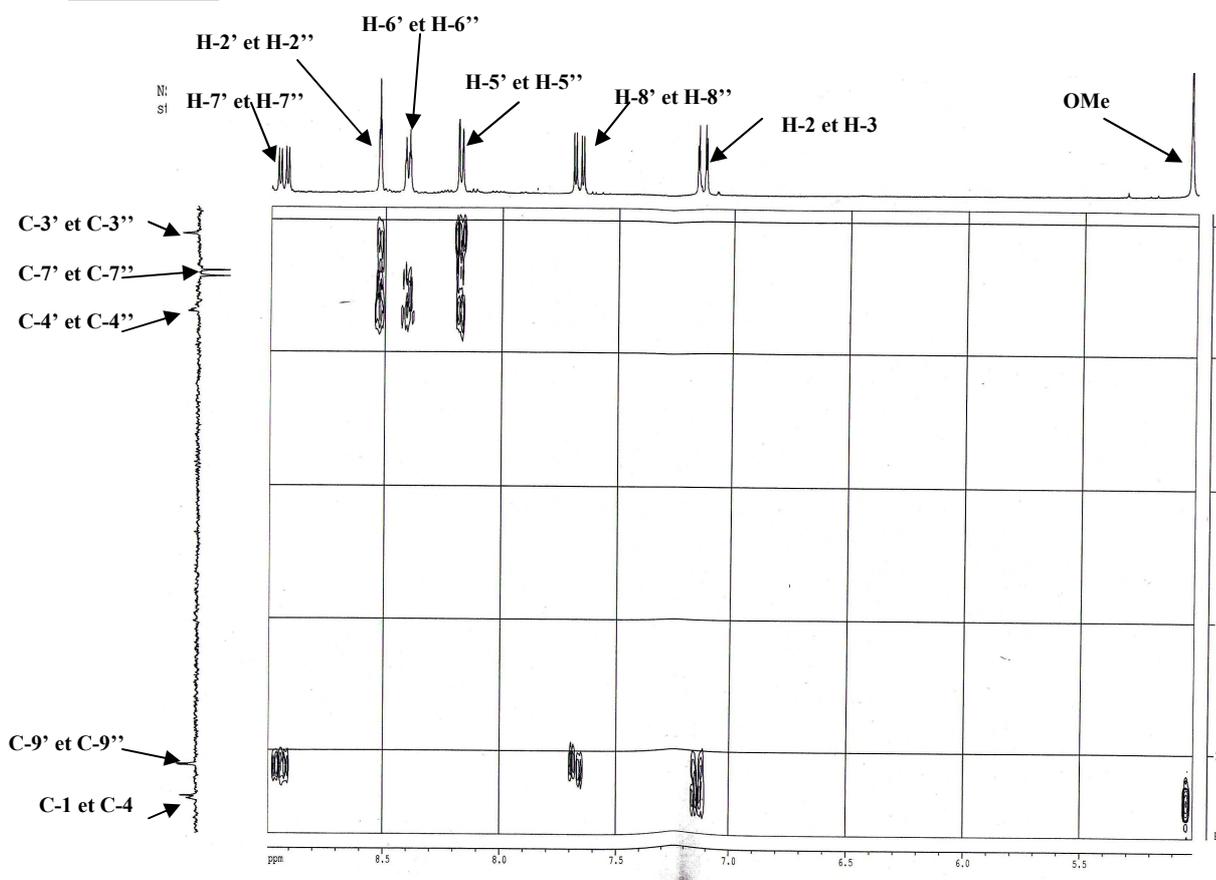


Figure-112: Etallement du spectre HMBC (500MHz, CD₃OD+ CF₃COOD) du produit B₃₋₁₅.

La combinaison des données de la RMN-HSQC et HMBC avec le spectre J-modulé (figure-113) du composé B₃₋₁₅ nous ont permis d'attribuer les différents déplacements chimiques des atomes de carbone. Ces résultats sont représentés dans le tableau-76.

Tableau-76 : Données RMN-C¹³ (déplacements chimiques et constantes de couplage)*
du composé B₃₋₁₅.

Carbone	Déplacements chimiques
1	169,8
2	74
3	73,7
4	169,8
1'	129,3
2'	117,7
3'	148,5
4'	151,5
5'	118,6
6'	125,1
7'	149,9
8'	115,8
9'	168,5
1''	129,4
2''	117,7
3''	148,5
4''	151,5
5''	118,6
6''	125,2
7''	150,1
8''	115,9
9''	168,6
OMe	55,3

* : le spectre est enregistré dans le CD₃OD+CF₃COOD.

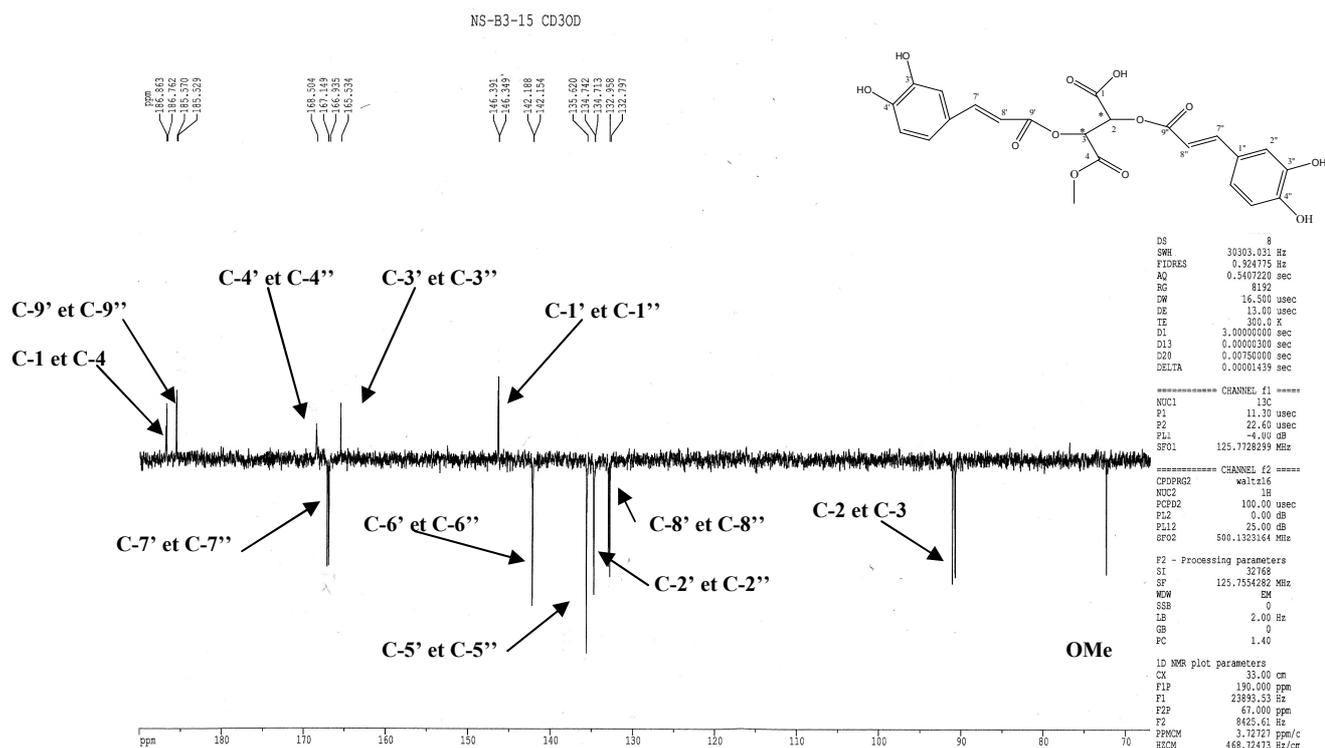
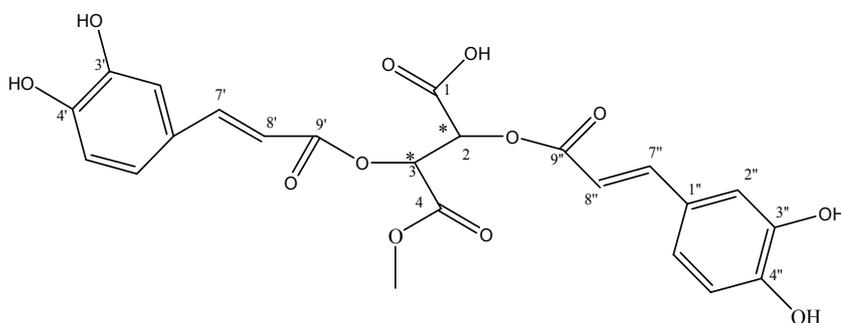


Figure-113 : Spectre J-modulé (125MHz, CD₃OD+CF₃COOD, δ ppm) du produit B₃₋₁₅.

L'ensemble des données spectroscopiques et analytiques nous permettent d'identifier le composé B₃₋₁₅ comme étant l'acide 4-méthoxy-di-E-caffeoyl tartarique. Afin de déterminer la stéréochimie de ce composé, son pouvoir rotatoire est mesuré à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241. Le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = +142$. La structure de ce composé est donc l'acide 4-méthoxy-di-E-caffeoyl-(2S,3S)-tartarique (monométhyle ester de l'acide chicorique). Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Veit *et al* 1991, Budzianowski *et al* 1997). Ce composé est isolé pour la première fois de la propolis.



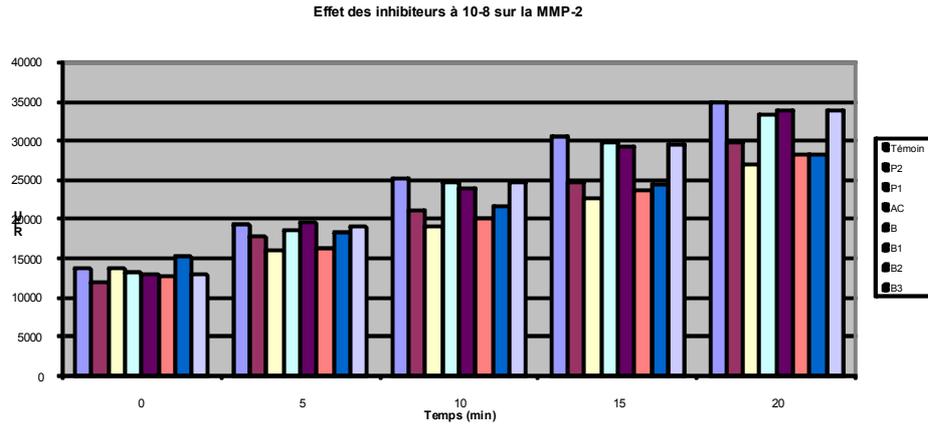
Acide 4-méthoxy-di-E-caffeoyl-(2S,3S)-tartarique (monométhyle ester de l'acide chicorique).

V-3-2-Evaluation de l'activité inhibitrice de la propolis :

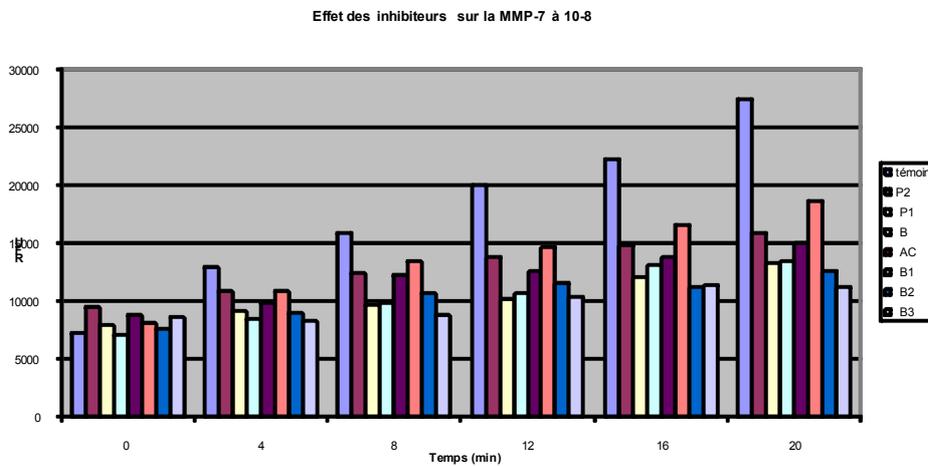
V-3-2-1-Effet inhibiteur des propolis sur l'activité enzymatique des MMPs :

Les extraits brut, acétate d'éthyle, butanolique, B₁, B₂ et B₃ sont testés aux concentrations de 0,01-1 µg/ml pour un éventuel effet inhibiteur des métalloprotéinases matricielles et des sérines protéases. Nous avons testé les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les collagénases (MMP-1), la matrillysine (MMP-7), la MMP-14, la MMP-3, l'élastase leucocytaire, l'urokinase et la plasmine. Dans un premier temps nous avons utilisé la technique de cinétique enzymatique pour déterminer les enzymes inhibées, les extrais actifs et les concentrations inhibitrices.

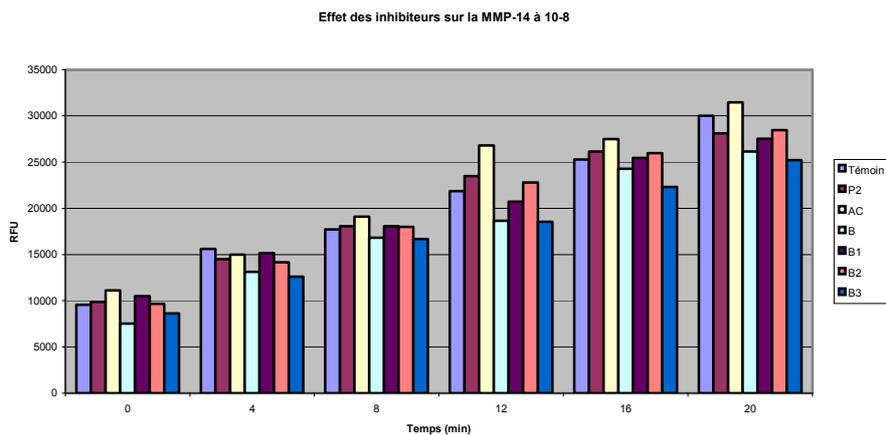
L'ensemble des extraits étudiés a montré une faible inhibition de la MMP-2 de 14,31% pour l'extrait brut, 3,25% pour l'extrait acétate d'éthyle, 3,10% pour l'extrait butanolique, 16,99% pour B₁, 9,41% pour B₂ et 2,91% pour B₃. Ces extraits ont montré une inhibition intéressante de la MMP-7. Le pourcentage de cette inhibition varie en fonction de l'extrait utilisé. Il est de 19,26% pour l'extrait brut, 24,62% pour l'extrait acétate d'éthyle, 35,71% pour l'extrait butanolique, 17,39% pour B₁, 34,10% pour B₂ et 36,47% pour B₃. Les extraits testés n'ont montré aucune inhibition de la MMP-14 à l'exception de la fraction B₃ pour laquelle le pourcentage d'inhibition est de 12,97%. Les extraits acétate d'éthyle, butanolique et B₃ inhibent fortement la plasmine et présentent des IC₅₀ de 7,71. 10⁻², 0,79 et 0,41 µg/ml respectivement. Ces extraits n'ont aucun effet sur l'activité de l'élastase leucocytaire et de l'urokinase. Ces résultats sont représentés dans le tableau-77 et la figure-114.



a- Effet des inhibiteurs sur la MMP-2 à 10⁻² µg/ml.



b-Effet des inhibiteurs sur la MMP-7 à 10⁻² µg/ml



b-Effet des inhibiteurs sur la MMP-14 à 10⁻² µg/ml.

P1 et P2 : extrait brut des propolis 1 et 2

B : Extrait butanolique

AC : extrait acétate d'éthyle.

B₁ , B₂ et B₃ : fractions de la phase butanolique.

Figure-114 : Effets des différents extraits de propolis sur les MMP-2, 7 et 14.

Tableau-77: Valeurs des IC₅₀ (µg/ml) des extraits de propolis pour la plasmine.

Extrait	IC ₅₀ µg/ml
Extrait ACOAT	0,41
Extrait butanolique	0,79
B ₃	7,71. 10 ⁻²

Parmi les extraits testés, la fraction B₃ semble plus intéressante. Cette fraction inhibe les MMP-3, MMP-7 et MMP-9 avec des IC₅₀ de 0,63, 0,10 et 2,38 µg/ml respectivement. Cependant, elle n'a aucun effet sur les MMP-1, MMP-2, MMP-14 et les sérines protéases (figure-115). Les tableaux 78 et 79 représentent les valeurs des IC₅₀ de B₃.

Tableau-78: Valeurs des IC₅₀ (µg/ml) de la sous fraction B₃ pour les MMPs.

Enzyme	IC ₅₀ µg/ml
MMP-1	>1
MMP-2	>1
MMP-3	0,63
MMP-7	0,10
MMP-9	2,38
MMP-14	>1

Tableau-79: Valeurs des IC₅₀(µg/ml) de la sous fraction B₃ pour les sérines protéases.

Enzyme	IC ₅₀ µg/ml
Plasmine	7,71. 10 ⁻²
Elastase leucocytaire	>1
Urokinase	>1

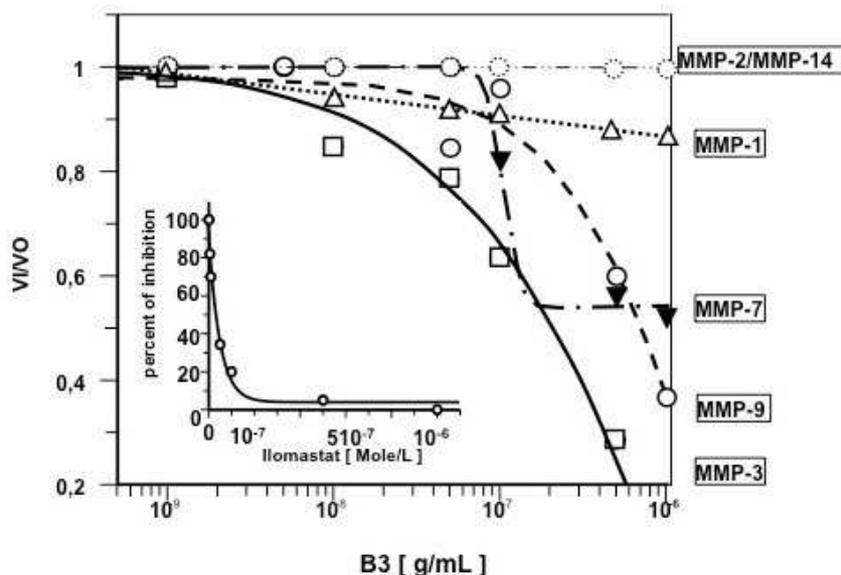


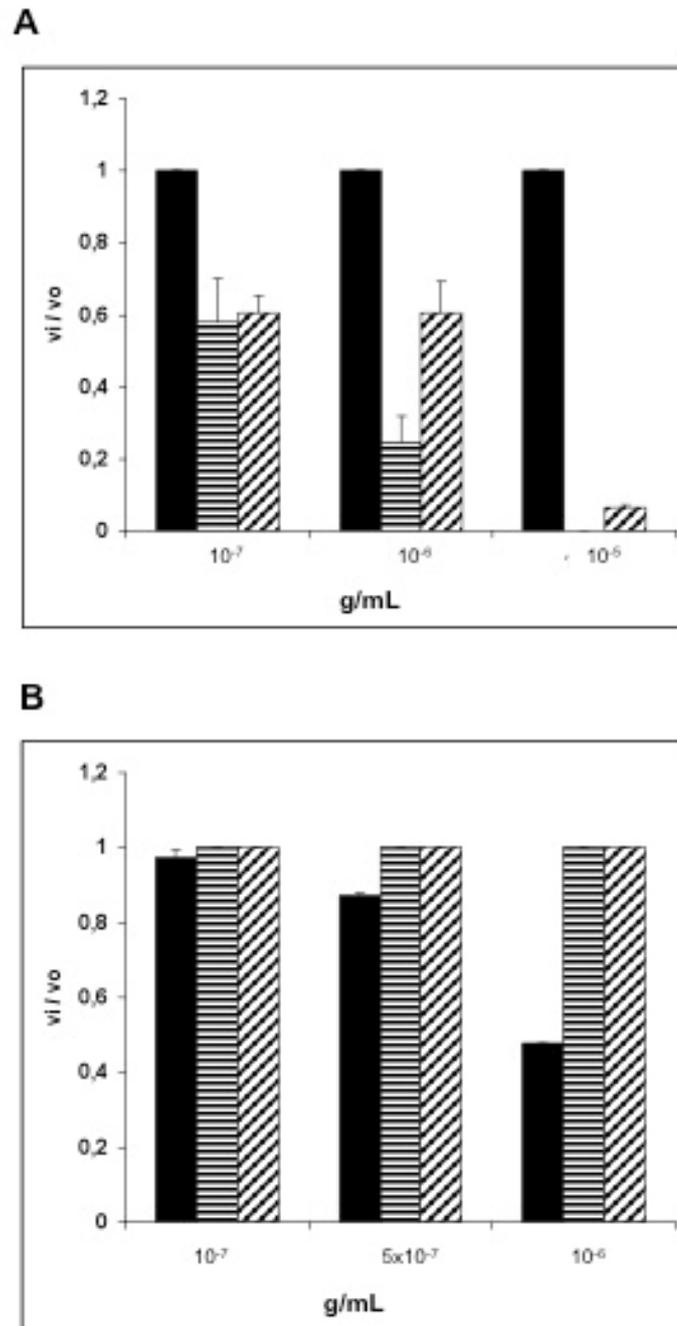
Figure-115 : Inhibition de l'activité des métalloprotéinases matricielles par la sous fraction B_3 .

La sous fraction B_3 est séparée et purifiée avec les différentes techniques chromatographiques pour donner : l'acide chicorique et son monométhyle ester, l'acide caféique, l'acide caftarique et son monométhyle ester. L'ensemble de ces produits est testé pour un éventuel effet inhibiteur de la MMP-3 et de la plasmine.

L'acide caftarique et son monométhyle ester sont dépourvus de toute activité vis-à-vis des deux enzymes testées. L'acide caféique est plus actif que l'acide chicorique et son monométhyle ester sur la plasmine pour laquelle nous avons obtenu une IC_{50} de 0,93 $\mu\text{g/ml}$. Par contre l'acide chicorique et son monométhyle ester sont plus actifs sur la MMP-3 avec des IC_{50} de 0,60 et 1,8 $\mu\text{g/ml}$ respectivement (tableau-80, figure-115).

Tableau-80: Valeurs des IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) des produits isolés de B_3 sur la plasmine et la MMP-3.

Composé	plasmine (IC_{50} in $\mu\text{g/ml}$)	MMP-3 (IC_{50} in $\mu\text{g/ml}$)
Acide caféique	0,93	>1
Acide chicorique	>1	0,60
Momomethyl ester de l'acide chicorique	>1	1,8



MMP-3 (A) and plasmin (B) activity. The bars indicate s.e.m. value. Aprotinin and ilomastat were used as positive inhibitory controls for plasmin and MMP-3 activity, respectively.

■ : caffeic acid (3) ; ▤ : (+)-chicoric acid (1); ▨ : chicoric acid monomethyl ester (2) as in g/mL.

Figure-115: Effets de l'acide caféique, de l'acide chicorique et son monométhyle ester sur l'activité de la plasmine et de la MMP-3.

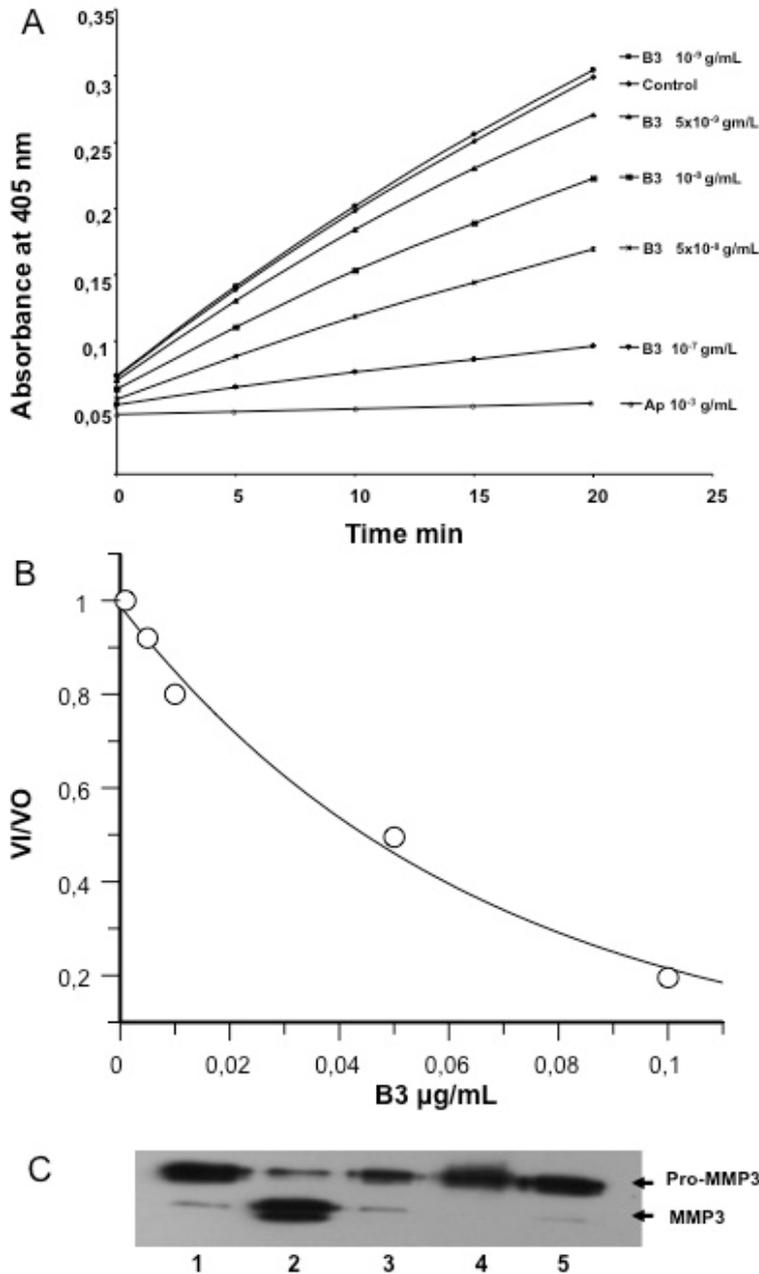
V-3-2-2- Effet de la propolis sur l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine :

V-3-2-2-1- In vitro :

Nos résultats concernant l'inhibition de l'activité de la plasmine et de la MMP-3 par la sous fraction B₃ nous ont encouragés à tester l'effet de cette sous fraction sur l'activation de la pro MMP-3 par la plasmine in vitro.

125 nM de pro-MMP-3 sont incubés avec 65 nM de plasmine en absence et en présence des effecteurs (extraits de propolis) aux concentrations de 0,5-1 µg/ml dans un tampon tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, PH 7,5 pendant 4 H à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par addition d'aprotinine. Les échantillons sont récupérés puis analysés par SDS-PAGE, électro-transférés et immuno-révélés à l'aide d'un anticorps anti-MMP-3 humaine reconnaissant les deux formes pro et active de cette enzyme.

La pro-MMP-3 est caractérisée par une bande de masse moléculaire 60-57 KDa. En présence de plasmine, une autre bande de 50-48 KDa apparait. Cette bande correspond à la forme activée de la MMP-3. L'activation de la pro-MMP-3 est donc due à l'action de la plasmine dont l'effet semble disparaître en présence d'aprotinine (apparition d'une seule bande correspondant à la pro-MMP-3 lorsque la plasmine est incubée en présence d'aprotinine). La présence de 1µg/ml de la sous fraction B₃ inhibe complètement l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine. Une inhibition d'environ 53,70% de l'activation de cette pro-enzyme est également observée en présence de 0,5 µg/ml de B₃ (figure-116).



A: effet de B₃ sur l'activité de la plasmine.

B: Relation dose/effet (X : concentration de B₃ (logarithmic scale), Y : VI/V₀).

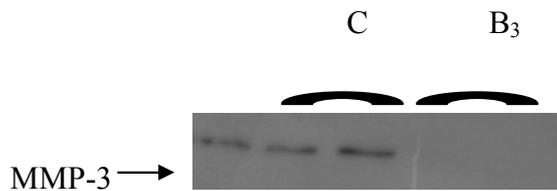
C : effet de B₃ sur l'avctivation de la pro-MMP3 par la plasmine (Western blot).

65 nM de plasmine humaine sont pré-incubés en présence ou en absence de la sous fraction B₃ (0,5 and 1 µg/ml) ou d'aprotinine dans un tampon 50mM tris test buffer, PH 7,5 ,150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 50mM tris amino. 125 nM de pro MMP-3 sont alors ajoutés. La réaction est stoppée après 4H d'incubation par addition d'aprotinine. Les échantillons sont ensuite analysés par western blot.

Figure-116: Effet de la sous fraction B₃ sur l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine.

V-3-2-2-2-Ex vivo :

Nous avons testé l'effet de la sous fraction B₃ sur l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine par des fibroblastes dermiques humains en culture. Les cellules sont incubées en présence ou en absence de 10µg/ml de B₃ dans un milieu contenant 20 µg/ml de plasminogène. Le clivage du plasminogène entraîne la génération de la plasmine qui active à son tour la pro-MMP-3 et libère la forme activée de cette enzyme détectée par Western blotting. Cette activation est complètement inhibée par 10µg/ml de B₃ (figure-117).



C: contrôle

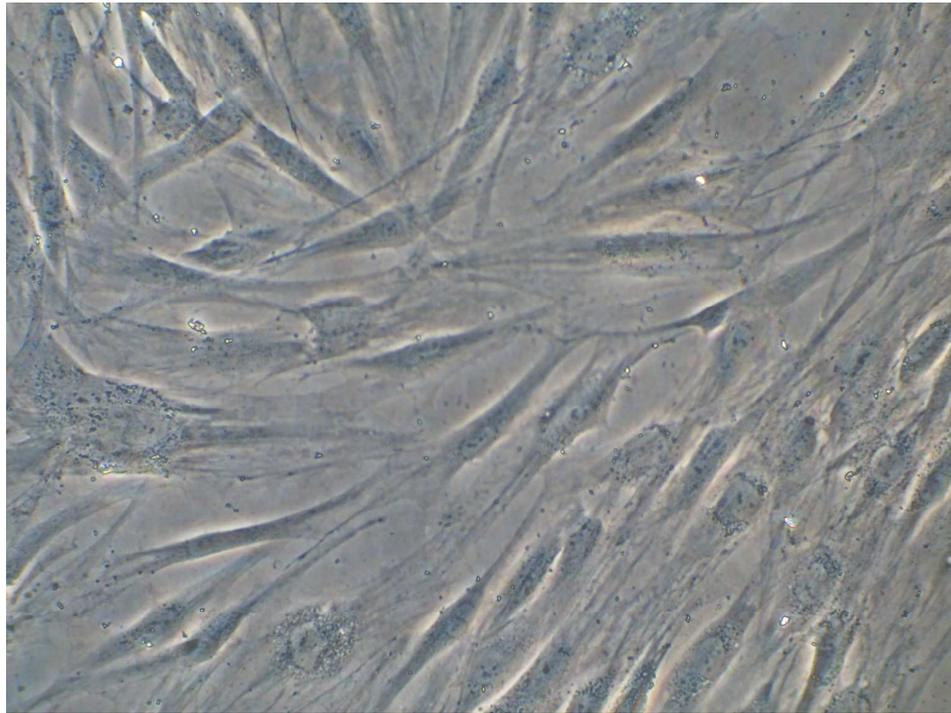
B₃: sous fraction active

Figure-117: Effet de la sous fraction B₃ sur l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine par des fibroblastes dermiques humains en culture.

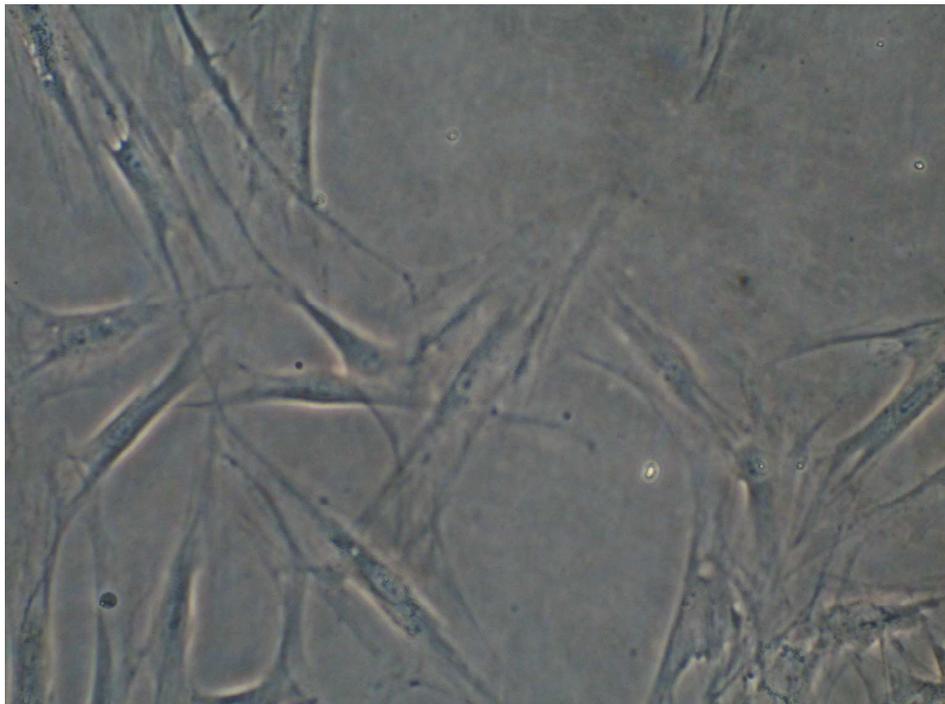
V-3-3-Influence de la propolis sur l'expression de la MMP-3 par les fibroblastes du derme humain en culture :

V-3-3-1- En absence d'UV-A :

Nous avons utilisé dans notre étude des fibroblastes dermiques humains (FDH) (figure-118). Le fibroblaste est une cellule différenciée d'origine mésenchymateuse qui présente de longs prolongements cytoplasmiques (Tarin et Croft 1969). Sa richesse en organites cytoplasmiques témoigne de sa grande activité métabolique. Les fibroblastes prédominent dans les tissus conjonctifs, synthétisent les éléments de la MEC incluant la tropoélastine, les collagènes de type I et III ...etc. Cette matrice leur permet de maintenir leur caractère différencié (Chang et al 2002, Tomasek et al 2002). Ils synthétisent également les protéases intervenants dans le catabolisme et le renouvellement des constituants matriciels dont de nombreuses MMPs (Simian et al 2001). Les fibroblastes se distinguent de beaucoup de types cellulaires par leurs capacités à conserver leurs morphologies en culture. A confluence, le phénomène d'inhibition de contact contraint les fibroblastes en culture à limiter leur prolifération et à constituer une monocouche cellulaire, caractéristique des fibroblastes normaux (Adolphe et Barlovatz-Meimon 1988).



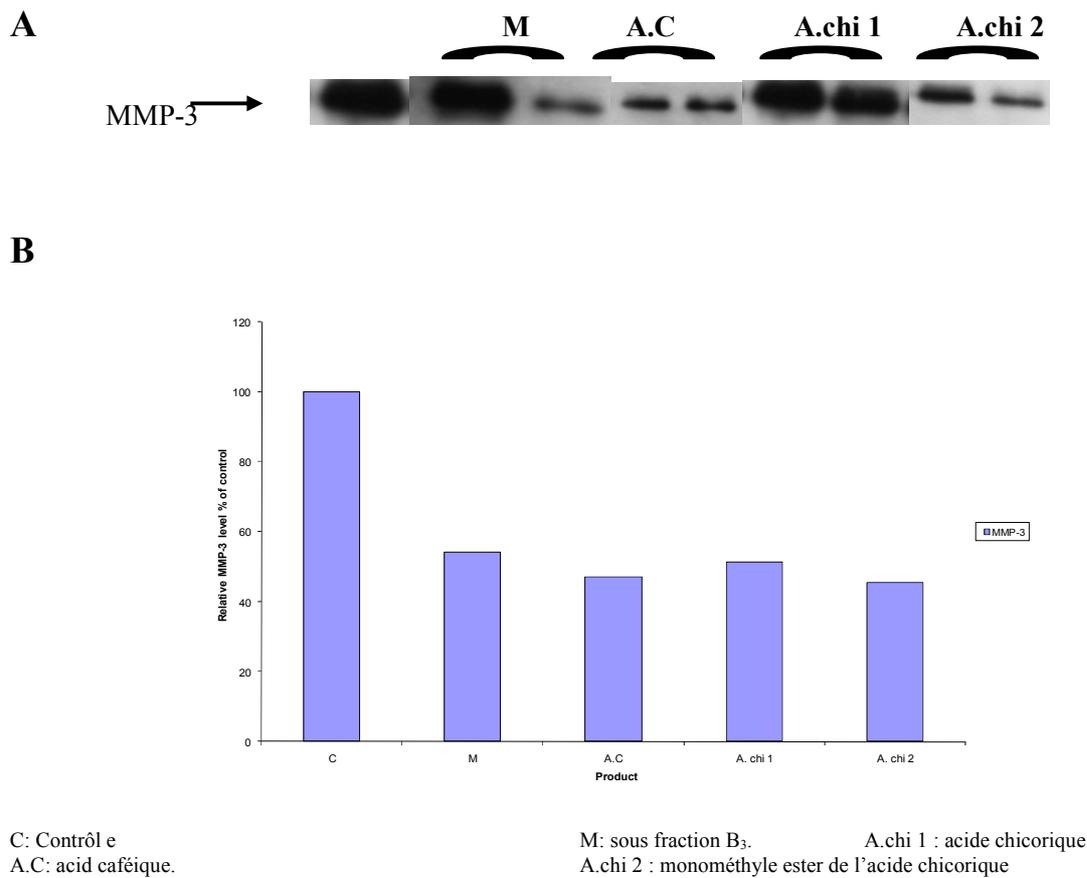
A : Grossissement X 100.



B : Grossissement X 400.

Figure-118: Fibroblastes dermiques humains en culture observés au microscope optique.

Nous avons testé l'effet de la propolis (sous fraction B₃) et des produits isolés sur l'expression de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture. Les cellules sont cultivées pendant 24 heures en présence ou en absence de 10 µg/ml de propolis (sous fraction B₃, acide caféïque, acide chicorique et son monométhyle ester). Le traitement avec la sous fraction B₃, l'acide caféïque, l'acide chicorique et son monométhyle ester inhibe l'expression de cette enzyme aux proportions de 45,88%, 52,91%, 48,69% et 54,6% respectivement (figure-119).



Les cellules sont cultivées pendant 24H en présence ou en absence de 10 µg/ml de propolis

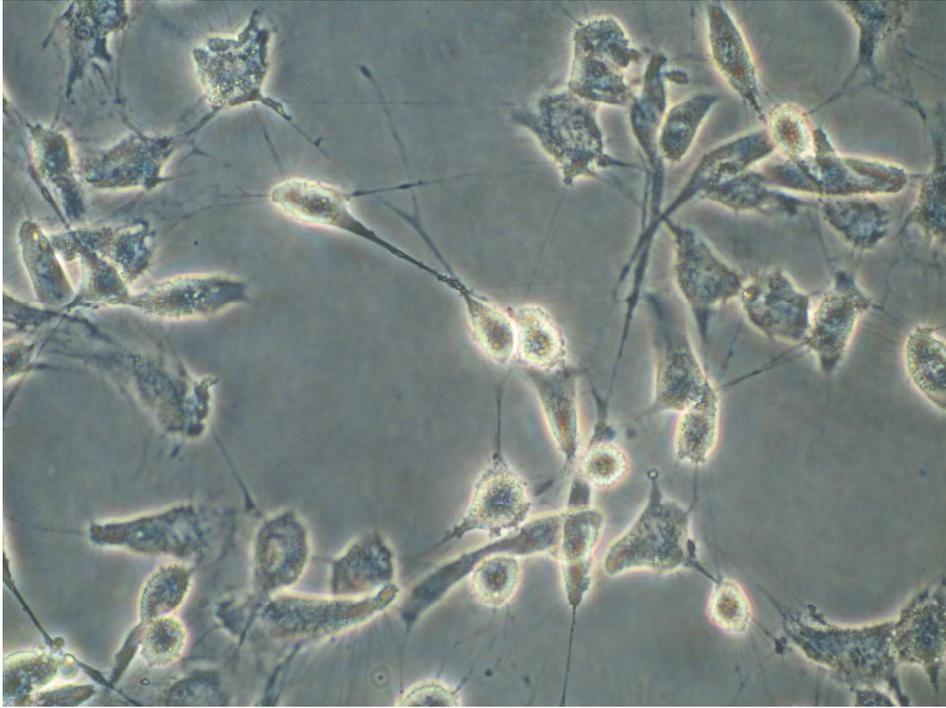
A: Western Blot.

B: Pourcentage d'inhibition de l'expression de la MMP-3. Exprimé en % contrôle.

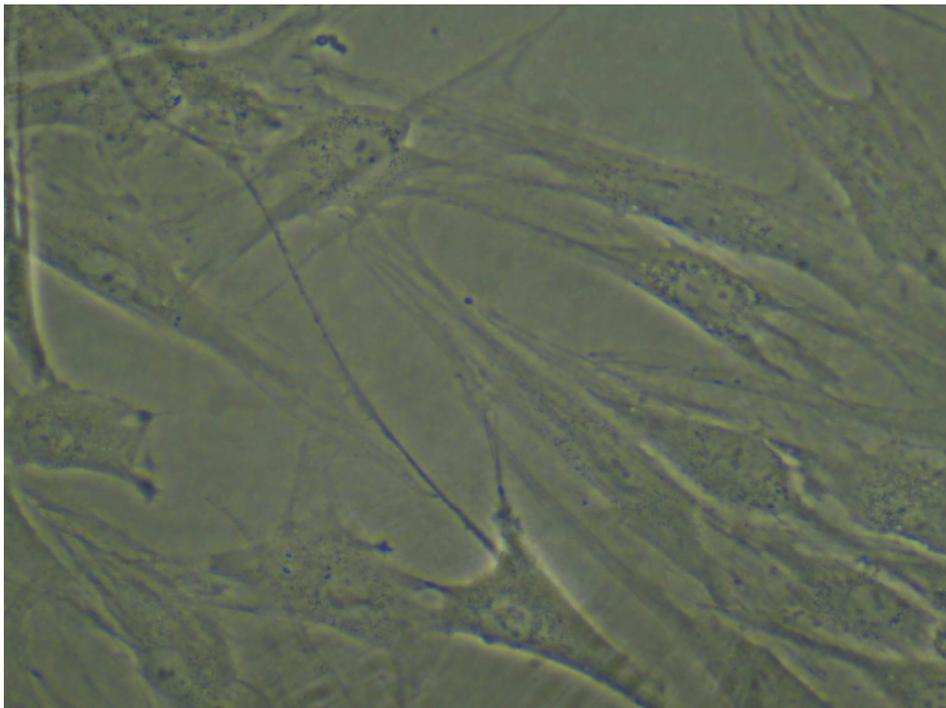
Figure-119: Effet de la propolis et des produits isolés sur la production de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture.

V-3-3-2- En présence D'UV-A :

Après irradiation les fibroblastes deviennent plus ou moins arrondis et perdent leur aspect filamenteux. Cependant, aucune mort cellulaire n'a été observée. Les cellules restent collées au fond de la boîte signe de leurs survies. Ces mêmes fibroblastes traitées par 10 µg/ml de propolis (sous fraction B₃ et produits isolés) pendant 24 heures présentent une morphologie cellulaire similaire à celle des cellules non irradiées (figure-120). Le dosage des protéines par la méthode de Bradford des deux populations de fibroblastes (irradiée et non) n'a montré aucune différence significative.



A : Fibroblastes après irradiation aux UV-A.



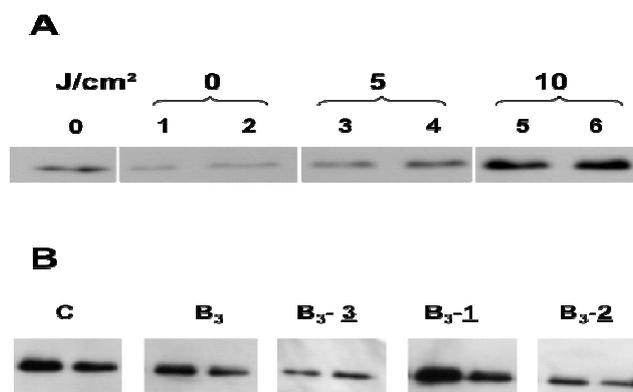
B : Fibroblastes irradiés après traitement avec les extraits de propolis.

Figure-120 : Fibroblastes dermiques humains après irradiation aux UV-A et traitement par les extraits de propolis observés au microscope optique.

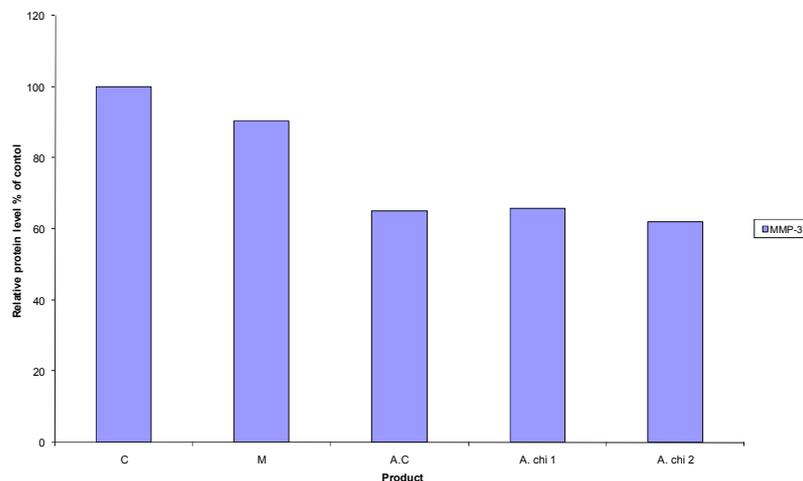
Nous avons testé l'effet de la propolis (sous fraction B₃) et des produits isolés sur l'expression de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture après irradiation aux UV-A.

Les cellules sont exposées à 10 J/cm² d'UV-A puis incubées pendant 24 heures en présence et en absence de 10 µg/ml de propolis. Le traitement avec B₃, acide caféique, acide chicorique et son monométhyle ester entraîne une inhibition de 54,2%, 52,91%, 48,59% et 56,1% de l'expression de la MMP-3 par rapport au contrôle (fibroblastes irradiés et non traités) (figure-121).

A



B



C:Contrôle

M: sous fraction B₃.

A.C: acide caféique

A.chi 1 : acide chicorique

A. chi 2 : monométhyle ester de l'acide chicorique

Les fibroblastes exposés à 10 J/cm² d'UV-A sont incubés en présence de 10 µg/ml de propolis pendant 24H.

L'expression de la MMP-3 est analysée par western blotting.

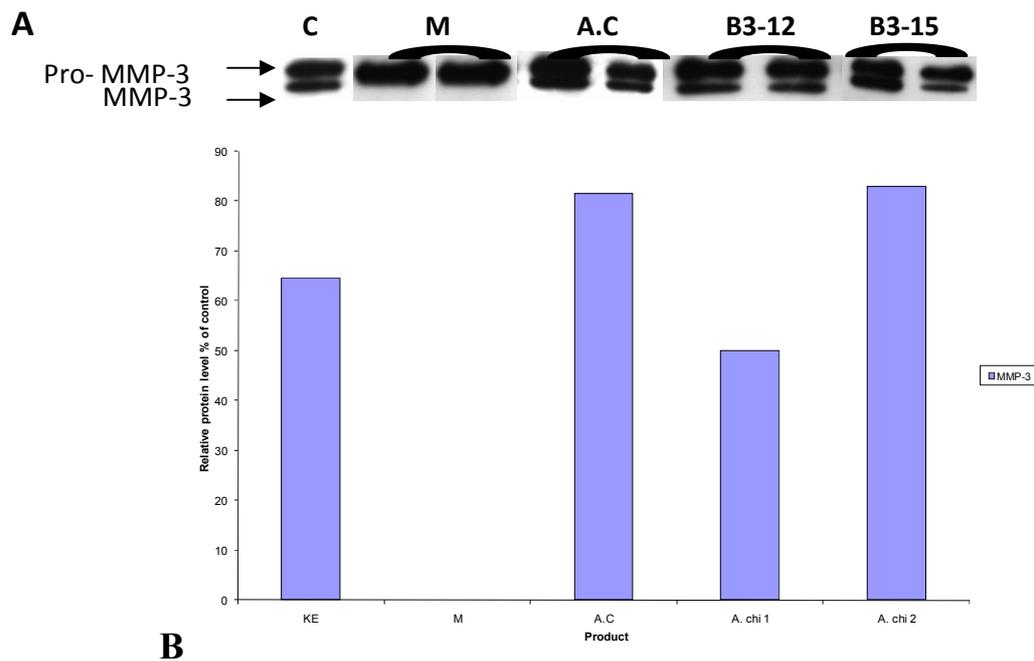
A: Western Blot.

B: Pourcentage d'inhibition de l'expression de la MMP-3. Exprimé en % contrôle.

Figure-121: Effet de la propolis et des produits isolés sur la production de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture après irradiation aux UV-A.

V-3-3-3- En présence de kappa-élastine :

Nous avons testé l'effet de la propolis (fraction active et produits isolés) sur l'expression de la MMP-3 après stimulation de sa production avec 50 µg/ml de kappa-élastine. Les cellules sont cultivées en présence ou en absence de 10 µg/ml de propolis pendant 24 heures. Le traitement avec la sous fraction B₃ entraîne une inhibition complète de la production de la MMP-3. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de cette enzyme est de 22,49% avec le monométhyle ester de l'acide chicorique. Les autres produits isolés de B₃ ne semblent avoir aucun effet sur cette enzyme (figure-122).



C: Contrôle

M: sous fraction B₃.

A.C: acide caféique

A.chi11: acide chicorique

A.chi 2: monométhyle ester de l'acide chicorique

Les cellules sont cultivées pendant 24 heures en présence ou en absence de 10µg/ml de propolis dans un milieu contenant 50 µg/ml de KE.

A: Western Blot.

B: Pourcentage d'inhibition de l'expression de la MMP-3. Exprimé en % contrôle.

Figure-122 : Effet de la propolis et des produits isolés sur la production de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture après stimulation avec 50 µg/ml de kappa-élastine.

Le vieillissement cutané résulte de phénomènes complexes déterminés tant génétiquement que par des facteurs de l'environnement dont le principal est l'exposition solaire (vieillessement actinique) conduisant à des anomalies du génome et/ou de l'organisation cellulaire et tissulaire. Ces deux processus sont étroitement associés et dans les deux cas la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) conduisant à un stress oxydatif semble un élément déterminant du vieillissement de la peau.

Les études animales ont montré que les ultraviolets A et B contribuent aux dommages à l'origine du vieillissement cutané et en particulier aux lésions d'élastose solaire. Grâce à des phénomènes de photosensibilisation, les UV provoquent un stress oxydatif par une production excessive d'ERO dans toutes les cellules cutanées et au niveau de la matrice extra-cellulaire du derme (Black 1987). Cette production excessive dépasse les capacités des systèmes de défense antioxydants endogènes conduisant à un stress oxydant intense.

Les ERO induisent un effet de peroxydation des lipides des membranes cellulaires, des dommages à l'ADN et des altérations des protéines modifiant leurs capacités fonctionnelles. Elles activent ainsi différentes voies de signalisation cellulaire en rapport avec la croissance, la différenciation des cellules cutanées et la dégradation du tissu conjonctif (Monteiro et Stern 1996). Les ERO entraînent aussi l'augmentation de l'expression et de la sécrétion des métalloprotéinases matricielles qui interviennent dans la dégradation de différents composants de la matrice extracellulaire dermique, expliquant les anomalies morphologiques du collagène et des fibres élastiques (Ramos-De Simone et al 1999, Brennensen et al 2002). L'ensemble de ses données soulignent l'importance du stress oxydatif dans les processus du vieillissement. L'utilisation donc de molécule antioxydante pour la prévention du vieillissement photo-induit apparaît comme une stratégie intéressante.

Les métalloprotéinases matricielles jouent un rôle très important dans le vieillissement photo-induit. De nombreux travaux réalisés sur des fibroblastes dermiques humains en culture ont montré que les radiations UV entraînent une augmentation de la production des MMP-1, MMP-3 et MMP-9. La MMP-3 (stromélysine-1) est synthétisée sous forme d'une pro-enzyme qui peut être activée par un système plasminogène / plasmine. L'activation du plasminogène en plasmine dépend d'une sérine protéase appelée urokinase (uPA) engendrant ainsi une cascade protéolytique. La stromélysine-1 (MMP-3) est capable d'activer à son tour les pro-MMP-1 et pro-MMP-9 (Ficher et al 1996). Cette enzyme constitue donc un point de contrôle de l'activation des MMPs. A l'état actuel, très peu d'inhibiteurs chimiques ont été développés et aucun d'entre eux n'agit de manière sélective contre l'une de ces enzymes.

Nous nous sommes intéressés dans le présent travail à l'effet inhibiteur de la propolis et de ses produits sur la production des MMPs et plus particulièrement la MMP-3 ainsi qu'à l'activation de sa forme pro (pro-MMP-3) par la plasmine. Un fractionnement bioguidé de la phase butanolique nous a permis de déterminer la fraction active de la propolis appelée B₃. Cette fraction inhibe l'activité de la MMP-3 et de la plasmine avec des IC₅₀ de 0,63 et 7,71 10⁻² µg/ml. Nous avons testé l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine. Cette activation est complètement inhibée par 10 µg/ml de B₃. La séparation bioguidée de cette fraction a offert cinq produits : l'acide caféique, l'acide cafatarique et son monométhyle ester et l'acide chicorique et son monométhyle ester.

L'acide caféique inhibe l'activité de la plasmine avec une IC₅₀ de 0,93 µg/ml. Cependant, les autres composés isolés n'ont aucun effet sur cette enzyme. De nombreux travaux en rapport avec l'activité de la plasmine ont montré que cette enzyme peut être inhibée par de nombreux produits naturels. Ces produits se fixent sur plusieurs domaines (kringles) de la plasmine provoquant ainsi son inhibition (Huet *et al* 2004). Ces résultats laissent supposer que l'effet des dérivés de l'acide caféique isolés de notre propolis peut être dû à la fixation de ces produits sur plusieurs domaines de la plasmine. Cependant nos essais ont montré que l'acide caféique n'a aucune action sur l'activité de la MMP-3. Par contre, l'acide chicorique inhibe fortement cette enzyme. La concentration des produits actifs de la propolis : acide caféique, acide chicorique et son monométhyle ester est de 2%, 4,5% et 4% au niveau de la fraction B₃. L'acide caféique n'a aucune action sur l'activité de la MMP-3. L'acide chicorique et son monométhyle ester inhibent cette enzyme et présentent des IC₅₀ de 0,60 et 1,8 µg/ml respectivement. Nous remarquons que l'acide chicorique est deux fois plus actif que son monométhyle ester. Ces deux composés sont présents à la même concentration au niveau de la fraction B₃ indiquant que l'effet de cette fraction est dû à la présence de l'acide chicorique.

La comparaison entre les structures chimiques des produits actifs de la propolis et leurs actions sur l'activité de la MMP-3 suggère que cette action est due à la présence des deux fonctions carboxyliques. Ces fonctions se fixent probablement sur les deux sites actifs de la MMP-3 (prime et umprime). La présence d'un groupement méthoxyle (monométhyle ester de l'acide chicorique) semble diminuer l'action de ces composés (dérivés de l'acide caféique). Plus d'études sont nécessaires pour déterminer le mode d'action de ces composés.

L'ensemble des produits actifs (acide caféique, acide chicorique et son monométhyle ester) est testé pour un éventuel effet inhibiteur de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture après irradiation avec 10 J/cm² d'UV-A. De nombreux travaux réalisés sur

des fibroblastes dermiques humains en culture ont montré que les radiations UV provoquent une augmentation de la production des MMP-1, MMP-9 et MMP-3 en stimulant différentes voies de signalisation comme la voie MAP-kinase et aussi en agissant sur certains facteurs comme le NF- κ B (Kheradmand *et al* 1998, Fisher *et al* 2009). Nos résultats ont montré qu'un traitement pendant 24 heures avec 10 μ g/ml d'acide caféique ou la même dose d'acide chicorique ou son monométhyle ester réduisait de plus de 50% l'expression de la MMP-3. Nous pensons que cet effet est probablement dû à l'action antioxydante des produits testés. Cependant, plus d'études sont nécessaires pour déterminer le mode d'action de ces produits.

Au cours du vieillissement cutané une dégradation du tissu conjonctif est observée. Cette dégradation génère des peptides pouvant avoir une activité biologique. Ces peptides ont donné naissance au concept « matrikine » (Maquart *et al* 1999). C'est le cas des peptides d'élastine avec une séquence VGVAPG. Ces peptides entraînent une surproduction des MMPs par les fibroblastes dermiques humains en culture (Huet *et al* 2001). Nous avons testé l'effet de la propolis et des produits isolés sur la génération de la MMP-3 après stimulation de son expression avec 50 μ g/ml de kappa-élastine.

La kappa-élastine stimule la production des pro-MMP-1, pro-MMP-2 et pro-MMP-3. Elle agit aussi sur la MT1-MMP et les TIMP-1 et TIMP-2 (Brassart 2000). Nos résultats ont montré que le traitement par 10 μ g/ml de B₃ (fraction active de la propolis) inhibe complètement la production de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture après stimulation de son expression avec 50 μ g/ml de kappa-élastine. L'activité de cette enzyme est inhibée de 22,49% après traitement avec 10 μ g/ml de monométhyle ester de l'acide chicorique. L'acide caféique, l'acide caftarique et son monométhyl ester et l'acide chicorique et son monométhyle ester n'ont aucun effet sur cette enzyme.

Enfin, notre travail montre que la fraction B₃ composée de l'ensemble des produits décrit précédemment inhibe complètement l'expression de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture après une surproduction de cette enzyme par les radiations UV ou l'ajout de kappa-élastine. Cette fraction inhibe aussi l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine au niveau de ces mêmes cellules. Cette fraction agit donc de manière sélective sur la MMP-3. De plus, elle est susceptible d'empêcher l'activation des pro-MMP-1 et pro-MMP-9 en inhibant l'activation de la forme pro-enzyme de la MMP-3 par le système plasminogène/plasmine. Cette fraction facile à obtenir constitue donc un mélange très intéressant pour le développement de nouvelle préparation cosmétique à effet anti-âge agissant en complément avec les autres crèmes et préparations existantes. De plus, la structure chimique de l'acide chicorique peut être utilisée comme modèle pour la synthèse et le développement d'inhibiteurs

sélectifs de la MMP-3. Ces inhibiteurs sélectifs peuvent être utilisés dans la prévention du vieillissement photo-induit ou pour le traitement d'arthrite rhumatoïde, d'athérosclérose ou de périodontite.

Références :

- Abd El Hady, F. K., Hegazi, A. G (2002). Egyptian propolis 2. Chemical composition, Antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Z Naturforsch* **57c**, 386-394.
- Abd El Hady, F. K, Hegazi, A. G., Wollenweber, E (2007). Effect of Egyptian propolis on the susceptibility of LDL to oxidative modification and its antiviral activity with special emphasis on chemical composition. *Z Nutorforsch* **62c**, 645-655.
- Abdusalam, K. S., Mohamed, M., El-Nawawy, M. A (1989). Effect of propolis on some bacterial species. *Egyptian Journal of Phytopathology* **21 (1)**, 61-68.
- Adolphe, M., Barlovatz-Meimon, G (1988). Culture de fibroblastes. Culture de cellules animales, Méthodologie et applications (éds INSERM): p 141-142.
- Bae Lee, H., Kwak, J. H., Zee, O. P., Yoo, S. J (1994). Flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Chemistry of natural compounds* **17 (4)**, 273-277.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M. C (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* **70**, 190-193.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Pureb, O., Bocari, G (1994). Volatile constituents of propolis. *Z Naturforsch* **49**, 6-10.
- Bankova, V., Popov, S., Marekov, N. L (1982). High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J of Chromatography* **242**, 135-143.
- Banskota, A. H., Nagaoka, T., Sumioka, L. Y., Tuzuka, Y., Awale, S., Midorikowa, K., Kadota, S (2002). Antiproliferative activity of Netherlands propolis and its principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* **80**, 67-73.
- Black, H. S (1987). Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* **46**, 213-221.
- Bonvehi, J. S., Ventura, F., Escala Jorda, R (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietics. *JOACS* **71 (5)**, 529-532.
- Borcic, I., Radonic, A., Grzunov, K (1998). Comparaison of the volatile constituents of propolis gathered in different regions of Croatia. *Flav Frag J* **11**, 311-313.
- Brassart, B. Influence des peptides dérivés de l'élastine sur les expressions des métalloprotéinases matricielles par les fibroblastes dermiques humains et les cellules issues de fibrosarcome humain en culture (2000). Thèse de doctorat. Université de Reims.

- Brehon, S., Giraud, C., Certain, A (2000). L'alcool dans les médicaments; analyses des risques et de l'information des spécialités administrées par voie orale ou injectable. *Journal de Pharmacie Clinique* **1(19)**, 32 Pharmacothérapie.
- Brennensen, P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K (2002). UV-B irradiation and matrix metalloproteinases : from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad* **973**, 31-43.
- Budzianowski, J (1997). Coumarins, caffeoyl tartaric acid and artifactual methyl esters from *Taraxacum officinale* leaves. *Planta Medica* **63**, 288-289.
- Chang, H. Y, Chi, J. T., Dudoit, S., Bondre, C., Van de Rijn, M., Botstein, D., Brown, P. O (2002). Diversity, topographic differentiation and positional memory in human fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci U S A* **99 (20)**, 12877-12882.
- Cheminat, A., Zawawatzky, R., Becker, H., Brouillard, R (1988). Caffeoyl conjugates from Echinacea species: structures and biological activity. *Phytochemistry* **27**, 2787-2794.
- Chen, L. J., Games, D. E., Jones, J (2003). Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high speed counter-current chromatography. *J of chromatography A* **988**, 95-105.
- Cizmarik, J., Trupl, J (1976). Effect of propolis on bacteria. *Pharmazie* **31**, 656-7.
- Claude, N., Grumbach, N (2003). *La rousse médicale* (3^{ème} édition).p 764, 798.
- Drago, L., Mombelli, B. D. E., Vacchi, E., Fassina, M. C, Tocalli, L., Gismondo, M. R (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemother* **12 (5)**, 390-5.
- Ficher, G. J, Datta, S. C., Talwar, M. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J. J (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 335-339.
- Fisher, G. J., Quan, T., Purohit, Y., Cho, M. K., He, T., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J. J (2009). Collagen fragmentation promotes oxydatif stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged skin. *Am J pathol* **174**, 101-114.
- Flamini, G., Antognoli, E., Morelli, I (2001). Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bacteata* from Italy. *Phytochemistry* **57**, 559-564.
- Gabrys, J., Konecki, J., Krol, W., Scheller, S., Shani, J (1986). Free amino acids in bee hive product (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. *Pharm Res Commun* **18**, 513-518.
- Gil, A. M., Duarte, I. F., Crodejohann, M., Braumann, U., Maraschin, M., Spraul, M (2003). Characterization of aromatic composition of some liquid food by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* **488**, 35-51.

- Grayer, R. J., Veitch, N. C., Kite, G. C., Price, A. M., Kokubun, T (2001). Distribution of 8 oxygenated leaf surface flavones in the genus *Ocimum*. *Phytochemistry* **56**, 559-567.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R (1987). The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc R Soc (Lond) Ser B* **232**, 249-272.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World* **71**, 107-118.
- Gregoris, E., Stevanato, R (2010). Correlation between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 76-82.
- Hase, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Picheansoonthon, C (1995). Revised structure for hosteinsin, a flavonoid from *Millingtonia Hotensis*. *Phytochemistry* **40 (1)**, 287-290.
- Hasegawa, M., Taneyama, M (1973). Chicoric acid from *Onychium japonicum* and its distribution in the ferns. *Bot Mag Tokyo* **86**, 315-317.
- Hashimoto, T., Tori, M., Asakawa, Y., Wollenweber, E (1988). Synthesis of two allergenic constituents of propolis and poplar bud excretion. *Z Naturforschung* **43**, 470-2.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B (1987). Propolis allergy I. Origin properties usage and literature review. *Contact dermatitis* **17**, 163-70.
- Hegazi, A. G, Abd El Hady, F. K (2002). Egyptian Propolis: 3-Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands . *Z Naturforsch* **57c**, 395-402.
- Hegazi, A. G 1997. Propolis an overview. International Symposium on Apitherapy Cairo 8 and 9th Egypt.
- Huet, E., Cauchard, J. H., Berton, A., Robinet, A., decarme, M., Hornebeck, W., Bellon, G (2004). Inhibition of plasmin-mediated prostromelysin-& activation by interaction of long chain unsaturated fatty acids with kringle 5. *Biochem Pharmacol* **67**, 643-654.
- Huet, E. Contrôle des cascades protéolytiques (système plasminogène/ plasmine et metalloprotéinases matricielles) impliquées dans la progression tumorale: stimulation par les peptides d'élastine et inhibition par l'acide oleique. Thèse de doctorat. Université de Reims (2001).
- Jarrahi, M., Safakhah, H. A., Vafaci, A. A (2004). Effect of propolis on wound healing in albino rats. *Iranian journal of pharmaceutical research* **2**, 46-46.
- Juang, F. C., Chen, Y. F., Lin, F. M., Huang, H. F (2005). Constituents from the leaves of *Lantana camara*. *Journal of Chinese Medicine* **16**, 149-155.

- Kartal, M., Kaya, S., Kurucu, S (2002). GC-MS analysis of propolis from two different regions of Turkey. *Z Naturforsch* **57c**, 905-909.
- Keskin, N., Selc, U. K. Hazin., Hüsünacan Baser, K., Mine Kürkc Uoglu (2001). Antibacterial and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch* **56c**, 1112-1115.
- Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., Werb, Z (1998). Role of Rac-1 and oxygen radical in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* **280**, 898-902.
- Kleinrok, Z., Borzechi, Z., Scheller, S., Mutaga, W (1978). Biological properties and clinical applications of propolis. *Arzneim Forsch* **28 (2)**, 291-292.
- Koo, H., Gomes, B. F. A., Rosalen, P. L., Ambrasano, G. M. B., Park, Y. K., Cury, J. A (2000). In vitro antimicrobiol activity on propolis and *Arnica-montana* against oral pathogens. *Arsh Oral Biol*, **45 (2)**, 141-148.
- Krell, R (1996). Value-Added products from beekeeping. FAO Agricultural services. Bulletin n^o 124.
- Kujungiev, A., Tsvetkova, L., Serkedjieva, Y., Bonkova, V. S., Christov, R., Popov, S (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* **64(3)**, 235-40.
- Kumazawa, S., Hawasaka, T., Nakayama, T (2004). Antioxidant activity of propolis from various geographic origin. *Food chemistry* **84 (3)**, 329-339.
- Lee, J., Scagel, C. F (2009). Chicoric acid found in Brasil (*Ocimum brasiliicum* L) leaves. *Food Chemistry* **115**, 650-656.
- Lim, S. Y., Hwang, J. Y., Yoon, H. R., Paik, Y. S (2007). Antioxidative phenolics from the petals of *Carthamus tictorius*. *J Appl Biol Chem* **50 (4)**, 304-307.
- Llorach, R., Martinez-Sanche, A., Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I., Ferreres, F (2008). Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five varieties and escarole. *Food Chemistry* **108**, 1028-1038.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York.
- Maier, T., Sanzenbacher, S., Kammerer, D. R., Berrardini, N., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., Schieber, A (2006). Isolation of hydroxycinnamoyltartaric acids from grape pomace by high speed counter-current chromatography **1128**, 61-67.
- Maquart, F. X., Simeon, A., Pasco, S., Monboisse, J. C (1999). Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracellulaire: le concept de matrikine. *J Soc Biol* **193**, 423-28.

- McNab, H., Ferreira, E. S. B., Hulme, A. N., Quye, A (2009). Negative ion ESI-MS analysis of natural yellow drye flavonoids. An isotopic labelling study. *International Journal of Mass Spectrometry* **284**, 57-65.
- Melliou, E., Stratis, E., Chinou, I (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-Antimicrobial activity. *Food Chem* **103**, 375-380.
- Monteir, H. P., Stern, A (1996). Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radic Biol Med* **21**, 323-333.
- Nagy, E., Pápay, V., Litkei, G. Y., Dinya, Z (1985). Investigation of the chemical constituents particularly the flavonoids components of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. In: *Flavonoids and Bioflavonoids* (L Farkas, M Gábor, F Kallay, eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands: 233-240.
- Park, E. K., Kim, S-H., Park, S. S (1996). Anti-Inflammatory activity of propolis. *Archivies pharmacy research* **19 (15)**, 337-41.
- Park, Y. K., Matias of Alencar, S., L-Aguiar, Claudio (2002). Estado da composição de meãs E propolis oriundos de mesma colméia .*Mensagem Doce* : 68.
- Pinheiro, M. R. B., Xavier, C. M., De souza, A. D. L., Robelo, D. M., Batista, R. L., Costa, E. V., Campos, F. R., Barison, A., Valdez, R. H., Heda-Nakanuwa, T., nakamura, C. V (2009). Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). *J Braz Chem Soc* **20 (6)**, 1095-1102.
- Qiao, Z., Chen, R (1991). Isolation and identification of antibiotic constituents of propolis from Henane. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **16 (8)**, 481-2, 512.
- Ramos-De Simone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L., Quingley, J (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* **274**, 13066-13076.
- Rhajaoui, M., Oumzil, H., Faid, M., Lyagoubi, M., Elyachioui, M (2001). Antibacterial activity of a Moroccan propolis extracts. *Sciences letters* **3 (3)**, 201-207
- Scarpati, M. L., Oriente, G (1958). Chicoric acid (dicaffeyltartaric acid) : its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis 1958. *Tetrahedron* **4**, 43-48.
- Scheller, S., Stojko, A., Szwarmowiecka, I., Tustanowaki, J., Obuszko, Z (1977). Biological properties and clinical applications of propolis. VI- Investigation of the influence of ethanol extract on cartilaginous tissues regeneration. *Aizneim Forsch* **27(11)**, 2138-2140.
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., Bissell, M. J (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* **128 (16)**, 3117-3131.

- Sumayono, W., Wahono, P., Proksh, P., Way, V., Witte, I., Hartmann, T (1991). Qualitative and quantitative analysis of the phenolics constituents from *Ortosiphon aristatus*. *Planta Medica* **57**, 176-180.
- Tabera, T., Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Alvarez, A., Vangives Horst, A (2000). Actividad antibacteriana De propoleos Argentinos enfrentados a staphylococcus aureus. Congreso International De propoleos Bueonos-Airos-Argentina.
- Tarin, D., Croft, C. B (1969). Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *J Anat* **105** (Pt 1), 189-190.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R. A (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3** (5), 349-363.
- Veit, M., Strack, D., Czygan, F. C., Wray, V., Witte, L (1991). Di-E-caffeoyl-meso-tartaric acide in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. *Phytochemistry* **30** (2), 527-529.
- Voirin, B (1983). UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3', 4') or tri-(3', 4', 5')-substitutedb rings. *Phytochemistry* **22** (10), 2107-2145.
- Won, S. R., Hong, M. J., Kim, Y. M., Li, C. Y., Kim, J. W., Rhee, H. I (2007). Oleic acid : an efficient inhibitor of glycosyltransferase. *FEBS Letters* **581**, 4999-5002.
- Yang, F., Li, X. C., Wang, H. Q (1996). Flavonoids glycosides from *Cholebrookea oppositifolia*. *Chemistry of natural compounds* **42** (3), 867-869.

Conclusion :

Le but de notre travail a été l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis algérienne. En premier lieu, nous nous sommes intéressés à plusieurs propolis de l'Est algérien. Une étude comparative en fonction de leurs profils chimiques, compositions en huiles essentielles et activité antibactérienne est réalisée.

Les tests effectués par chromatographie analytique sur papier et sur couche mince, ainsi que l'absorption en UV-visible et l'aspect des extraits ont permis une première classification des propolis en deux groupes. Une première série de résultats nous a permis de constater que les propolis testées présentent des éléments similaires dans leurs compositions. De plus, ces propolis sont riches en flavonoïdes. Nos essais montrent qu'il existe une relation entre l'origine de la propolis et sa composition chimique.

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des propolis testées sont analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Dans toutes les huiles essentielles analysées les acides représentent 4,34%, 5,32% et 12,3% pour P₁, P₂ et P₃. Les monoterpènes représentent 1,55%, 2,74% et 6,90%. Les sesquiterpènes représentent 2,24% de l'huile de P₁. Cette classe est absente dans la composition de l'huile de P₂. Elle est présente à l'état de trace dans la composition de l'huile de P₃. Le rendement et la composition des huiles essentielles de la propolis varient en fonction de la zone de la récolte. Ces variations sont en rapport avec l'origine botanique de la propolis.

Il est intéressant de noter que l'huile essentielle des propolis algériennes testées est très riche en acides, hydrocarbures, alcools, aldéhydes et cétones. Cette composition est très différente des autres études rapportées sur les propolis du Brésil (Bankova *et al* 1994 et 1999), Croatie (Borcic *et al* 1998) et Grèce (Melliou *et al* 2007) qui sont plus riches en monoterpènes et sesquiterpènes. Cette différence est probablement due aux différences géographiques et climatiques qui influencent l'origine botanique de ces propolis. Des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer l'origine botanique de la propolis algérienne. Ces études permettront une meilleure classification de notre propolis.

L'évaluation de l'effet antibactérien des différentes propolis testées est réalisée sur onze souches bactériennes sauvages et résistantes (six à Gram- négatif et cinq à Gram-positif). Nous avons déterminé la concentration minima inhibitrice pour chaque germe. Les résultats obtenus montrent qu'à l'exception d' *E.coli* ATCC 25922 les propolis testées sont plus actives sur *S.aureus* et les streptocoques β et non hémolytiques. Par contre, elles sont peu actives sur les bacilles à Gram négatif étudiés. Nos propolis ont une activité contre les cocci à Gram positif essentiellement. Ces propolis agissent comme certaines familles d'antibiotiques à spectre étroit comme les macrolides. Nos tests montrent que la propolis est très active sur le

streptocoque β hémolytique, germe le plus incriminé au cours des angines rouges. De ce fait nous pensons que son utilisation comme adjuvant du traitement antibiotique peut accélérer la guérison.

Notre travail montre qu'il existe une relation entre l'effet antibactérien de la propolis et sa composition en produits flavoniques. Nous pensons que la composition qualitative et quantitative en flavonoïdes est très importante. Cette composition permettra une meilleure classification de la propolis. Elle permettra aussi la standardisation de ce produit pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

Cette première partie nous a permis de choisir une propolis sur laquelle nous avons réalisé une étude plus approfondie. Nous nous sommes intéressés à l'effet cicatrisant de cette propolis. Cette activité est étudiée en complément de l'activité antibactérienne pour expliquer l'efficacité rapportée de l'utilisation de la propolis en médecine traditionnelle dans le traitement des plaies infectées. Nos tests se sont concentrés sur la comparaison de l'effet local de certaines préparations à base de propolis. Nos résultats ont montré que la propolis possède une faible activité cicatrisante. Ces résultats laissent supposer que la propolis pourrait avoir une activité anti-inflammatoire. Elle agirait au niveau de la phase initiale de la cicatrisation. De plus, cette propolis pourrait avoir un effet sur la deuxième phase. D'autres études plus approfondies concernant d'autres propolis algériennes sont nécessaires pour déterminer l'activité cicatrisante de la propolis. Une augmentation de la surface des plaies pourrait donner des résultats plus précis. Nous avons remarqué que l'application répétée de l'extrait éthanolique de propolis et du remède à base de propolis durant 18 jours sur la peau des animaux n'entraîne aucun phénomène d'hypersensibilité.

La cicatrisation d'une plaie est un phénomène biologique naturel. Les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération. Cette capacité reste cependant soumise à de nombreuses variations. Ainsi la rapidité et la qualité de la cicatrisation d'une plaie dépendent de l'état général de l'organisme atteint. De nombreux médicaments sont utilisés pour accélérer ou faciliter la cicatrisation. La plupart sont des pommades à action locale qui agissent directement au point de contact. De nombreux soins utilisent des pansements imbibés d'une solution antiseptique qui vise à désinfecter la plaie et à assurer l'humidité de la peau lésée pour faciliter sa réparation.

En dermatologie l'objectif des remèdes à visée cicatrisante est multiple, il s'agit de protéger cette zone tissulaire en plein remaniement, à la fois des germes infectieux et des traumatismes physiques, tout en apportant une action eutrophique continue. Notre travail montre que la propolis peut entrer dans la composition des solutions antiseptiques ainsi que

les remèdes à visée cicatrisante. La propolis de part son activité antibactérienne peut empêcher la survenue d'infection et permettre ainsi une cicatrisation plus rapide des plaies.

Dans la deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la propolis algérienne. Après extraction, séparation et purification nous avons obtenu 16 composés à l'état pur. Ces composés appartiennent à 3 classes de métabolites secondaires et primaires: 3 acides gras, 5 dérivés de l'acide caféique dont 4 sont isolés pour la première fois de la propolis (acide caftarique et son monométhyle ester et l'acide chicorique et son monométhyle ester) et 8 flavonoides dont 2 sont rapportés pour la première fois (ladaneine et pilosin). La détermination structurale de ces composés a été réalisée à l'aide des différentes techniques spectroscopiques de RMN mono (RMN- H^1 , RMN- C^{13} , dept et J-modulé) et bidimensionnelles (NOSY, HSQC, HMBC) ainsi que la spectrométrie de masse EI-MS. Les 14 composés isolés sont identifiés comme suit :

- ✓ *Acide (9Z) octadec-9-énoïque (acide oleïque).*
- ✓ *Acide cis, cis-9, 12 octadecadiénoïque (acide linoléique).*
- ✓ *Acide icosanoïque.*
- ✓ *Acide-3,4-dihydrocinnamique (acide caféique)*
- ✓ *Acide cafféoyl-(2R, 3R)-tartarique (acide caftarique).*
- ✓ *Acide 4-méthoxy-monocafféoyl-(2R, 3R)-tartarique (monométhyle ester de l'acide caftarique)*
- ✓ *Acide di-E-cafféoyl-(2S, 3S)-tartarique (acide chicorique).*
- ✓ *Acide 4-méthoxy-di-E-cafféoyl-(2S, 3S)-tartarique (monométhyle ester de l'acide chicorique).*
- ✓ *5,4'-dihydroxy-3,7-diméthoxyflavone (kumatakenin)*
- ✓ *5, 7, 4'-trihydroxyflavone (apigénine).*
- ✓ *5, 4'-dihydroxy-7,3-méthoxyflavone.*
- ✓ *5, 6, 3', 4'-tétrahydroxy-7-méthoxyflavone.*
- ✓ *5, 7-dihydroxy-7, 4'-diméthoxyflavone (pectolinarigénine).*
- ✓ *5, 7, 8-trihydroxy- 7, 4'-diméthoxyflavone (pilosin).*
- ✓ *5, 6-dihydroxy-7, 4'-diméthoxyflavone (ladaneine).*
- ✓ *5, 7-dihydroxyflavone (chrysin).*

Dans la dernière partie de notre travail nous nous sommes intéressés à l'effet anti-âge de la propolis et de ses polyphénols ainsi qu'à leurs actions sur l'expression et l'activation de la MMP-3, enzyme clé dans l'activation des pro-MMP-1 et pro-MMP-9 via le système plasminogène / plasmine dans les conditions normales et après stimulation de sa

surproduction par les irradiations UV (UV-A) et les peptides d'élastines (kappa-élastine). Un fractionnement bioguidé de l'extrait butanolique nous a permis de déterminer la fraction active de la propolis appelée B₃. La séparation bioguidée de cette fraction a offert cinq dérivés de l'acide caféique.

La fraction B₃ composée de l'ensemble des produits décrit plus loin inhibe complètement l'expression de la MMP-3 par les fibroblastes dermiques humains en culture après une surproduction de cette enzyme par les radiations UV ou l'ajout de kappa-élastine. Cette fraction inhibe aussi l'activation de la pro-MMP-3 par la plasmine au niveau de ces mêmes cellules. Cette fraction agit donc de manière sélective sur la MMP-3. De plus, elle est susceptible d'empêcher l'activation des pro-MMP-1 et pro-MMP-9 en inhibant l'activation de la forme pro-enzyme de la MMP-3 par le système plasminogène/ plasmine. Cette fraction facile à obtenir constitue donc un mélange très intéressant pour le développement de nouvelles préparations cosmétiques à effet anti-âge agissant en complément avec les autres crèmes et préparations existantes. D'autres études plus approfondies sont nécessaires. Elles permettront une meilleure connaissance des principes actifs de la propolis et de leur structure. Elles permettront aussi de mieux connaître le mécanisme d'action de ses molécules ainsi que leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamie.

Références :

- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M. C (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* **70**, 190-193.
- Borcic, I., Radonic, A., Grzunov, K (1998). Comparaison of the volatile constituents of propolis gathered in different regions of Croatia. *Flav. Frag. J* **11**, 311-313.
- Melliou, E., Stratis, E., Chinou, I (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-Antimicrobial activity. *Food Chem* **103**, 375-380.

Annexes :

VI-I-Volatils constituents of algerian propolis.

Segueni. N, Khadraoui. F, Moussaoui. F, Zellagui. A,Guerraf. N, Lahouel. M, Rhouati. S. Annal of Biological Research 2010 : 103-107.



Volatil constituents of *Algerian propolis*

Narimane Segueni ^a, Fatiha Khadraoui ^b, Faïrouz Moussaoui ^a, Amar Zellagui ^{a*},
Noureddine Gherraf ^a, Mesbah Lahouel^c and Salah Rhouati ^a

^a *Laboratoire de produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique. Département de chimie. Université mentouri de constantine 25000.Algérie*

^b *Laboratoire régional de la police scientifique- laboratoire de toxicologie criminalistique Constantine 25000.Algérie*

^c *Département de pharmacologie et phytochimie, Université de Jijel, Algérie.*

Abstract

Hydrodistillation of three Algerian propolis collected in different locations of east of Algeria (El-malha, Benibelaïd and Kaous) afforded a yellowish oil in a yield of approximately 0.03% to 0.11%. A total of 54 compounds were identified across all the samples representing about 74% of total content of each sample. Components were mainly monoterpenes, sesquiterpenes, acids and alkanes. GC-MS analysis indicated that the predominant components of the essential oil of propolis of El-malha were 2-hexenal (4.85%), myristic acid (2.03%), linoleic acid (1.86%) and (-)-spathulenol (1.6%). Nevertheless the predominant components of the essential oil of propolis of Benibelaïd were isooctane (3.89%), linoleic acid (2.18%), undecane (2.03%), myristic acid (1.65%), hexadecane (1.14%), p-cymene(1.21%), palmitic acid (1.05%) and 4-terpineol (1.03%). The major constituents of the essential oil of propolis of Kaous were 2-hexenal (11.15%), myristic acid (5.66%), linoleic acid (5.16%), carvacrol (4.47%), alpha-cedrol (2.57%) and p-cymene (1.27%).

Keywords: *Algerian propolis*, volatiles compounds, GC-MS.

INTRODUCTION

Propolis is a resinous hive product collected by honeybees from parts of plants, buds and exudates, and has been used in folk medicine since around 300 BC [1]. It was reported to possess several bioactivities such as: antibacterial [2,3], antifungal [4,5], antiviral [6], local anaesthetic [7], anti-inflammatory [8], hepatoprotective [9], antioxidant and antitumor [10].

Propolis is a very complex mixture and its chemical composition varies according to its location. Hundreds of chemical compounds have been identified from Propolis involving important

chemical families such as flavonoid aglycone, phenolics and diverse aromatic compounds. It also contains some volatiles components and bee wax [11].

The identification of secondary plant metabolites in Propolis are of great importance in the development of the pharmacognosy. Its volatile compounds were reported to be of a considerable biological effect in spite of their low composition.

Propolis Essential oils have been investigated previously in Brazil [12, 13, 14], Croatia [15] and Greece [16]. In the present study we aim to investigate the composition of volatile oils of Propolis from eastern Algeria.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Essential oils isolation:

Algerian propolis harvested in 2006 was used to carry out the present work. The collection sites are abbreviated as follows: sample P₁ from El-malha in Mila, sample P₂ from Benibelaïd in Jijel and sample P₃ from Kaous in Jijel.

The essential oil of Propolis was extracted by hydrodistillation and collected in diethyl ether after 4 hours of distillation, prior to be separated in a funnel. The aqueous fraction was extracted twice with diethyl ether. The organic phase was dried on anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated under vacuum. Oil yield was then estimated and the oil composition was analysed by GC-MS.

2.2. Gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) analysis:

Analysis of essential oil was performed using a Perkin Elmer Clarus 500 gas chromatograph, equipped with an Elite-5MS capillary column (60m X 0.255mm i.d., 0.25µm film thickness, made in USA) and a mass spectrometer detector. The carrier gas was helium at a flow rate of 1ml/min. Oven temperature was initially 40°C for 10 min and was then gradually increased to 270°C at 3°C/min. For GC-MS detection, an electron ionization system was used with ionization energy of 70 eV.

Each extract was diluted in 1: 100 (V/V) with n-hexane to obtain solutions A, B and C (from P₁, P₂ and P₃). From each originally diluted sample, 40µl was diluted 1:4 (V/V) with n-hexane and placed in headspace vials with bevelled tops. The solutions, together with a blank sample, were loaded on a headspace auto sampler and, according to a predominated batch sequence; the samples were injected automatically in scan mode. The scan repetition rate was 0.5 s over a mass range of 50-450 atomic mass units (amu). Injector and detector temperature were both set at 250°C.

Identification of the components of the volatiles oils was based on retention indices and computer matching with Wiley libraries and the National Institute of Standards and Technology (NIST). The components of Propolis essential oils were determined by considering their area as percentage of the total ion current.

RESULTS AND DISCUSSION

The hydrodistillation of Propolis gave yellowish oil with a yield of 0.03% for P₁ and P₃ and 0.11% for P₂. 37, 26 and 30 compounds were identified in the essential oils of propolis from El-malha, Benibelaïd and Kaous respectively. The compositions of volatile oils are given in table 1.

Table 1: Constituents of the essential oil of Algerian propolis

Compounds	R _t	P ₁ (%)	P ₂ (%)	P ₃ (%)
2-nonanoe	17,42	0,55	-	-
cyclopentanol, 3-methyl	17,92	1,25	-	-
2-hexenal	24,61	4,85	1,14	11,15
1-octanal	26,82	-	0,64	-
Cyclohexane, diethyl	27,32	1,01	0,50	-
1,2,3,5 tetramethyl cyclohexane	28,02	0,04	1,86	Traces
Isooctane	30,33	0,23	3,89	-
Undecane	30,92	0,46	2,03	0,34
Trans-alpha dihydroterpineol	31,81	-	0,09	-
DL- limonene	32,72	0,03	0,09	0,09
Decane	33,73	-	0,39	0,95
1-phenyl-2-butanone	34,10	0,02	-	-
Dodecanal	34,57	0,01	0,96	0,89
Prehnitol	35,32	-	0,32	0,02
<i>p</i> -cymene	35,86	-	1,21	1,27
Nonanol	36,85	-	-	0,34
1H indene 2,3 dihydromethyl	36,96	0,01	-	0,08
1-methyl indene	36,98	-	0,06	-
1(-)-indene,1 methylene	36,98	-	0,20	-
D-isomenthol	37,11	0,03	-	-
+(R)- <i>p</i> -mentha-1,8 dien-4-ol	37,63	0,10	-	-
Trans pinocarveol	39,09	0,12	-	0,05
<i>p</i> -mentha-1,5 dien-8-ol	39,57	0,03	-	-
<i>p</i> -menth-1-ene-3,8 diol	40,55	0,22	-	0,12
Menthol	40,93	0,36	1,03	0,12
4-terpineol	41,03	0,33	-	0,05
<i>p</i> -cymene-8-ol	41,30	-	-	0,16
Naphthalene	41,43	-	-	0,16
1-H indene	41,53	0,07	-	-
<i>p</i> -menth-1-ene-8-ol	41,84	0,06	-	-
Dodecanal	42,15	0,02	-	-
1-dodecane	44,89	0,05	0,18	0,01
Thymol	46,06	-	-	4,47
Carvacrol	46,48	-	-	0,30
Tridecane	46,56	0,63	0,82	0,07
2,4 decadienal (E,E)	46,58	0,14	0,17	Traces
Cis-salvene	47,47	-	-	0,25
Camphene	48,87	Traces	-	-
Nerolidol	52,41	0,02	-	0,09
Germacrene D	54,58	Traces	-	-
(-)-spathulenol	58,88	1,6	-	-
Alpha-cedrol	60,26	0,15	-	2,57
Alpha-gurjunene	60,98	0,07	-	-
Hexadecane	61,21	0,28	1,14	-
Alpha-eudesmol	61,92	0,40	-	-
Palmitic acid	70,84	0,38	1,05	0,53
Myristic acid	71,92	2,03	1,65	5,66
9,12 octadecanoic acid(Z,Z)methyl ester	76,01	-	0,44	0,40
6-octadecanoic acid, methyl ester	76,21	0,07	-	0,55
Octadecane	76,34	1,01	0,07	-
1-dotricontanol	76,41	-	2,33	-
Methyl 13-methyltetradecanoate	77,19	-	0,36	-
Linoleic acid	77,51	1,86	2,18	5,16
Cyclotetradecane	80,65	-	6	0,30
Octacosane	83,65	0,32	-	-
Others	--	56,89	48,7	35,87

The components are listed in the order of their elution.

R_t : Retention time.; P_1 : Propolis of El-malha.; P_2 : Propolis of Benibelaid.; P_3 : Propolis of Kaous.

Twelve compounds were common between the oils of the samples, namely 2-hexenal, 1,2,3,5 tetra methyl cyclohexane, 2,4-decadienal (E,E), DL-limonene, dodecanal, menthol, 1-dodecane, tridecane, undecane, palmitic acid, myristic acid and linoleic acid; but with different rates. For example the undecane was 2.03 % in P_2 oil but only 0.46% and 0.34% in P_1 and P_3 .

The major constituents of the essential oil of P_1 were 2-hexenal (4, 85%), myristic acid (2.03%), linoleic acid (1.86%) and (-)-spathulenol (1.6%).

The major constituents in P_2 were isooctane (3.89%), linoleic acid (2.18%), undecane (2.03%), myristic acid (1.65%), hexadecane (1.14%), p-cymene (1.21%), palmitic acid (1.05%) and 4-terpineol (1.03%).

The major constituents in P_3 were 2-hexenal (11.15%), myristic acid (5.66%), linoleic acid (5.16%), carvacrol (4.47%), alpha-cedrol (2.57%) and p-cymene (1.27%).

In all the analysed oils, acids represent 4.34%, 5.32% and 12.3% in P_1 , P_2 and P_3 respectively). Monoterpene hydrocarbons and oxygen containing monoterpenes represent 1.55%, 2.74% and 6.90% respectively (Table 2).

Table 2: composition of particular classes of compounds in Propolis essential oil

Grouped components	P_1 (%)	P_2 (%)	P_3 (%)
Monoterpene hydrocarbons	0,03	1,30	1,61
Oxygen-containing monoterpenes	1,25	1,44	5,26
Sesquiterpene hydrocarbons	0,07	-	-
Oxygen-containing sesquiterpenes	2,17	-	2,66
Aliphatic hydrocarbures	5,04	11,38	1,68
Aromatic hydrocarbures	0,08	0,26	0,24
Acids	4,34	5,32	12,3
Alcohols, phenols,aldehydes and cetones	6,84	5,60	12,38
Others	56,89	48,70	35,87

Propolis of Kaous is rich in oxygenated monoterpenes (carvacrol 4.47%) while propolis of Benibelaid contains monoterpene hydrocarbons (menthol 1.03%). Sesquiterpenes represent 2.24% of the oil of P_1 (0.02% nerolidol, 1.6% (-)-spathulenol, 0.41% alpha eudesmol, 0.15% alpha-cedrol and 0.07% alpha-gurjunene), but only traces of sesquiterpenes hydrocarbons were detected in P_3 . Oxygen containing monoterpenes represent 2.66% of the total oil of P_3 . These classes of compounds were absent in P_2 .

It is interesting to note that *Algerian propolis* is very rich in acids, hydrocarbons, alcohols, aldehydes and ketones. Compared to previous reports on Propolis essential oils from other localities [12, 13, 14, 15, 16], the compositions of present analyses are quite different. It is possible that this difference is due to the botanical origin of the tested Propolis. Other research will be pursued to determine the plant origin of *Algerian propolis* and its chemical composition especially volatile compounds and flavonoids contents.

Acknowledgement

Partial financial support by MESRES (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique) are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] A.G Hegazi, F.K Abdel Hadi, F.A.M Abd Allah, *Z. Naturforsch* 55C, **2000**, 71-75.
- [2] E.L Gisalberti, *Bee World* 60, **1979**, 59-84.
- [3] M. Velikova, V.Bankova, I.Tsetkova, A.Kujungiev, *Fitoterapia*. **2000**. 71, 693-696.
- [4] V.Dimov, N.Ivanoska, N.Manolova, V.Bankova, N.Nicolov, S.Popov, *Apidologie*. **1991** 22, 155-162.
- [5] J.M.Murad, S.A.Calvi, A.M.V.C.Soaes, V.Bankova, J.M.Sforcin, *Ethnopharm*, **2002**, 79, 331-334.
- [6] M.Amaros,E.Lurton, J.Boustic, L.Girre, F.Sauvager, M.Carmier, *J.Nat.Prod*, **1994**, 57, 644-647.
- [7] M.Paintez, J.Metzner, *Pharmazie*, **1979**, 34, 839-841.
- [8] H.Miyataka, M.Nishiki, H.Matsumoto, T.Fujimoto, M.Matsuka, T.Sotah, *Biol.Pharm.Bull*, **1997**, 20, 497-501.
- [9] A.H.Banskota, Y.Tezuka, SH.Kadota, *Phytother Res*, **2000**, 15, 561-571.
- [10] G.A.Burdock, *Food.Chem.Toxicol*, **1998**, 36, 347-363.
- [11] V.S Bankova, S.L.Decastro, M.C.Marcucci, *Apidologie*, **2000**, 31, 3-15.
- [12] V.Bankova, R.Christov, O.Pureb, G.Bocari, *Z.Naturforsch* 49C , **1994** , 6-10.
- [13] V.Bankova, R.Christov, S.Popov, M.C.Marcucci, *Fitoterapia*, **1999**, 70, 190-193.
- [14] R.N.Soaes Toress, J.A.Dantas Lopes, J.M.Machado Moia Neto, A.M.das Graças Lopes Cito, *Qui.Nova* , **2008**, 31 (3) , 479-485.
- [15] I.Borcic, A.Radonic, K.Grzunov, *Flav.Frag.J*, **1998**, 11, 311-313.
- [16] E.Melliou, E.Stratis, I.Chinou, *Food. Chem*, **2007**, 103, 375-380.

VI-II-Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from propolis sample from Algeria.

Segueni. N, Abdul Magid. A, Decarme. M, Rhouati. S ,
Lahouel. M, Antonicelli. F, Lavaud. C, Hornebeck. W. *Planta Medica* february 2011 (e-first).

Inhibition of Stromelysin-1 by Caffeic Acid Derivatives from a Propolis Sample from Algeria

Authors

Narimane Segueni^{1,3}, Abdulmagid Alabdul Magid², Martine Decarme¹, Salah Rhouati³, Mesbah Lahouel⁴, Frank Antonicelli¹, Catherine Lavaud², William Hornebeck¹

Affiliations

The affiliations are listed at the end of the article

Key words

- propolis
- matrix metalloproteinase (MMP)
- MMP-3 inhibitors
- plasmin
- caffeic acid
- chicoric acid

Abstract

Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3: MMP-3) occupies a central position in collagenolytic and elastolytic cascades, leading to cutaneous intrinsic and extrinsic aging. We screened extracts of a propolis sample from Algeria with the aim to isolate compounds able to selectively inhibit this enzyme. A butanolic extract (B₃) of the investigated propolis sample was found to potently inhibit MMP-3 activity (IC₅₀ = 0.15 ± 0.03 µg/mL), with no or only weak activity on other MMPs. This fraction also inhibited plasmin amidolytic activity (IC₅₀ = 0.05 µg/mL) and im-

peded plasmin-mediated proMMP-3 activation. B₃ was fractionated by HPLC, and one compound, characterized by NMR and mass spectroscopy and not previously identified in propolis, i.e., (+)-chicoric acid, displayed potent *in vitro* MMP-3 inhibitory activity (IC₅₀ = 6.3 × 10⁻⁷ M). In addition, both caffeic acid and (+)-chicoric acid methyl ester present in fraction B₃ significantly inhibited UVA-mediated MMP-3 upregulation by fibroblasts.

Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/plantamedica>

Introduction

Alterations of the dermal collagen and elastin fibers networks are hallmarks of intrinsic and ultraviolet-mediated cutaneous aging [1] and have been mainly attributed to the action of matrix metalloproteinases (MMPs) [2,3]. Upregulation of collagenase-1 (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression has been consistently found to be associated with dermal fibroblasts senescence [3]. Accordingly, their production is similarly increased in skin fibroblasts isolated from aged individuals [4]. Besides, treatment of fibroblasts by UVA or exposure of buttock skin to solar radiation increased the production of MMP-1, MMP-3, and gelatinase B (MMP-9) [5]. To date, collagenolysis in aged skin is mainly attributed to MMP-1; MMP-9, in turn, proved to exhibit potent elastinolytic activity [6]. Importantly, MMP-3 is one main catalyst of pro-MMP-1 and pro-MMP-9 activation [7]; to that respect, it can be considered as the pivotal control element in collagenolysis and elastolysis as occurring during skin aging. These data also suggest that the development of MMP-3 inhibitors may represent a promising antiaging strategy for skin.

Propolis is a resinous hive product collected by honeybees from various plants, buds, and exudates. Its antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant, antiulcer, hepatoprotective, anti-inflammatory, and antitumoral properties are now well documented [8,9], and hundreds of distinct components have been identified in propolis. Furthermore, its composition mainly depends on the geographical location and on the type of vegetation where it is collected. Propolis from temperate zones predominantly contains phenolic compounds including flavonoids and cinnamic acid derivatives while diterpenes and prenylated compounds are identified in propolis from tropical zones [8]. Recently, caffeic acid and its phenylester (CAPE) from propolis were reported to inhibit the activity of several endopeptidases as neutrophil elastase [10,11] and gelatinases (MMP-2 and MMP-9) [12], but not MMP-1 and MMP-3 [13–15]. In keeping with the pivotal importance of MMP-3 in skin aging, a propolis sample from Algeria was sequentially extracted and fractions were evaluated for their ability to interfere with MMP-3 activity. A fraction from a butanol extract, designated as B₃, proved to inhibit MMP-3 as well as its plasmin-mediated activation. B₃ was frac-

received July 7, 2010
revised Dec. 16, 2010
accepted Dec. 28, 2010

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1270713>
Published online
Planta Med © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Prof. Catherine Lavaud
Laboratoire de Pharmacognosie
Université de Reims
Champagne Ardennes
Institut de Chimie Moléculaire
de Reims
UMR 6229 CNRS
Bâtiment 18, BP 1039
51687 Reims Cedex 2
France
Phone: + 33 3 26 91 35 48
Fax: + 33 3 26 91 31 66
catherine.lavaud@univ-reims.fr

tioned with the aim of identifying compounds able to interfere with MMP-3 expression, activation, and activity.

Materials and Methods

General experimental procedures

Optical rotations were measured in MeOH with a Perkin-Elmer 241 polarimeter. NMR spectra were recorded in CD₃OD on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz), and 2D-NMR experiments were performed using standard Bruker microprograms (XWIN-NMR version 2.6 software). Mass spectra ESI-MS were measured using a Thermo Finnigan MS-Q instrument. Column chromatography was carried out on Polyamide SC6 (Macherey-Nagel). Semipreparative HPLC was performed on a Dionex apparatus equipped with an ASI-100 autosampler, a STH 585 column oven, a P580 pump, a UVD 340S diode array detector, and the Chromeleon software.

Quenched fluorogenic substrates DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(*N*-Me-Abz)-NH₂ for MMP-1 or MMP-9 inhibition (where DNP, 2,4-dinitrophenyl; Cha, β -cyclohexylalanyl; Abz, 2-aminobenzoyl[anthraniloyl]) were purchased from Calbiochem (VWR); Mca-L-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ for MMP-2 or MMP-14 inhibition (where Mca stands for (7-methoxycoumarin-4-yl) all and Dpa, [*N*-3-(2,4-dinitrophenyl)-*L*-2,3-diaminopropionyl]) and 6-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxodiazol-4-ylamino)-hexanoyl-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-Lys(7-dimethylamino-coumarin-4-yl)-NH₂ for MMP-3 inhibition were from Bachem. Human recombinant proMMP-2, proMMP-9, proMMP-1, and catalytic domains of MT1-MMP and MMP-3 were obtained from Calbiochem. The pro-enzymes were freshly activated with 1 mM (for proMMP-2) or 2 mM (for proMMP-9 and proMMP-1) *p*-aminophenylmercuric acetate (Sigma-Aldrich) at 37 °C in a water bath for 2 hours.

Material

Propolis was collected in June 2006 in the Kheir Oued Adjoul village in the Beni belaïd area (longitude 6°07', latitude 36°52') by scraping the resinous mixture of walls, frames, and the entrance of the beehive. By the apiary, vegetables as eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), fig tree (*Ficus carica*), pomegranate (*Punica granatum*), blackberry bush (*Rubus fruticosus*), and barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) were grown. A voucher specimen (n°P2-06) was deposited at the Laboratory for Natural Products of Vegetable Origin and of Synthetic Organic Chemistry, Mentouri University of Constantine in Algeria.

Extraction and isolation

Propolis (500 g) was successively extracted at room temperature for 48 h with MeOH/CH₂Cl₂ (50:50; 3 × 1 L) and MeOH/H₂O (70:30; 3 × 1 L). The hydromethanolic extract (250 g) was suspended in 400 mL of distilled water, and the suspension was extracted successively three times with 300 mL of *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, and *n*-BuOH. The organic layers were concentrated under reduced pressure to obtain an *n*-hexane fraction (3 g), a CHCl₃ fraction (0.9 g), an EtOAc fraction (2.7 g), and an *n*-BuOH fraction (8.3 g). The latter was fractionated using polyamide SC6 column chromatography (4.5 × 70 cm column) eluted with an increasing polarity toluene/methanol solvent (from 100:0 to 0:100 with a 10% increase) and finally, with MeOH/H₂O (70:30, 50:50). For each eluent, volumes of 1 L were collected and gathered into 5 fractions (B₁–B₅) from their TLC profiles. The active fraction B₃

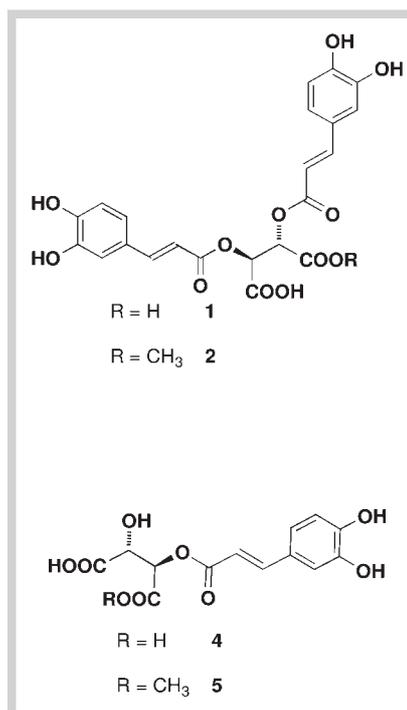


Fig. 1 Chemical structures of compounds isolated from propolis.

(270 mg) contained column fractions eluted with toluene/methanol mixture from 30:70 to 0:100. An aliquot of fraction B₃ (100 mg) was purified by semipreparative HPLC on a prepacked RP-18 column (Thermo Electron Corporation Hyperprep HS, 21.2 × 250 mm, 10 μ m) using H₂O/0.0025% TFA as eluent A and CH₃CN as eluent B at a flow rate of 5 mL/min and the chromatogram was monitored at 280 and 325 nm. An increasing linear gradient of solvent B, starting at 10% of B up to 50% in 45 min yielded (+)-chicoric acid (**1**) [16], 4.5 mg; *t*_R = 22.6 min; 95% purity, chicoric acid monomethyl ester (**2**) [16, 17], 4 mg; *t*_R = 29.7 min; 98% purity, caffeic acid (**3**) [18], 2 mg; *t*_R = 17.2 min; 90% purity, caftaric acid (**4**) [19], 2 mg, *t*_R = 12.8 min; 80% purity, and caftaric acid 1-methyl ester (**5**) [17, 19], 2.8 mg, *t*_R = 19.4 min; 80% purity (● **Fig. 1**; **Figs. 1S** and **2S**, Supporting Information). All the known compounds were identified by detailed NMR analysis and comparison of the NMR, MS, and [α]_D data with literature values, and the purity was determined by ¹H NMR (**Table 1S**, Supporting Information).

Enzyme assays

MMPs inhibition: Ten ng of MMP-1, MMP-2, or MMP-7, 25 ng of catalytic domain of MMP-3, 5 ng of MMP-9, and 12.5 ng of catalytic domain of MMP-14 were incubated with increasing concentrations of propolis compounds (from 0.01 to 1 μ g/mL). Assays were initiated by adding the appropriate fluorogenic substrate (1–10 nM). The fluorescence was monitored with a Perkin Elmer HT Soft 7000 plus spectrofluorimeter (Perkin Elmer). Upon cleavage of fluorogenic peptide by the MMP, the initial rate of peptide hydrolysis in absence (*V*₀) or presence (*V*_i) of propolis compounds was determined. IC₅₀ values were calculated after plotting *V*_i/*V*₀ as a function of propolis compounds concentration by fitting with a nonlinear regression analysis (Grafit Computer program, R. Leatherbarrow; Erithacus Software) [20]. Ilomastat (GM6001 purity > 95%) was used as a positive control [21] and obtained from Calbiochem.

Inhibition of serine proteases: Plasmin activity was monitored as previously reported [22]. Briefly, 200 μ L of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.8 containing 12 nM plasmin (VWR International) and 0.3 mM S-2251 (HD-Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilide; Chromogenix) were added in a 96-well low-binding titration plate (Nunc) and incubated in the presence or absence of propolis compounds (from 10^{-8} to 10^{-6} g/mL) for various periods at 22 °C. Aprotinin was obtained from Sigma-Aldrich and used as a positive control (3–8 Trypsin Inhibitor Unit/mg; purity > 98%).

Urokinase (VWR International) activity was determined using S-2444 (pyro-Glu-Gly-Arg-*p*-nitroanilide; Chromogenix) as described [14], and human leukocyte elastase (Elastin Products Company) activity was assessed using MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-nitroanilide (Sigma Chemicals) [10].

ProMMP-3 activation: Human plasmin (65 nM) was preincubated in the absence or presence of B₃-fraction or aprotinin (50 μ M) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl and 5 mM CaCl₂ for 15 min at 37 °C. ProMMP-3 (100 nM) was then added, and the reaction was allowed to proceed for 4 h at 37 °C. At the end of the incubation, aprotinin (50 μ M) was added to totally inactivate plasmin. The activation of proMMP-3 by plasmin was then evaluated by Western blot analysis.

SDS-PAGE and Western blot: MMP-3 was analyzed by Western blotting. Samples were submitted to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 10% (w/v) acrylamide under reducing conditions and proteins were electroblotted to the PVDF membrane (Immobilon-P from Millipore). The membrane was blocked with 5% (w/v) nonfat dry milk (Bio-rad) in 50 mM TBS buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl for 2 h at 20 °C. The blotted proteins were probed with primary antibody diluted in TBS-Tween (0.1% v/v) (TBS-T) containing 1% nonfat dry milk (w/v) overnight at 4 °C. Monoclonal antibodies against human MMP-3 (Oncogene) were used at 1/1000. After extensive washings with TBS-T, the membrane was incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1/10000) for 1 h at 20 °C. After extensive washings with TBS-T, the immunoreactive proteins were revealed by staining with enhanced chemiluminescent detection reagents (Amersham Biosciences). Stained bands were identified, and their intensities were quantified by densitometry with the Bio1D software (Vilbert-Lourmat).

Fibroblasts cultures and UVA irradiation

Human skin fibroblast strains were established from explants of human adult skin biopsies obtained from informed healthy volunteers (age: 21–49 years old). Cells were grown as a monolayer culture in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Aldrich Chemicals) supplemented with 10% fetal calf serum, 200 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, and 2 mM glutamine in the presence of 5% CO₂. Cells at subcultures 2–5 were used. For experiments, fibroblasts were grown to confluence in 10% serum-containing medium. Before UVA-stimulation, confluent cells were incubated for 18 h in DMEM containing 0.5% fetal calf serum, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in serum-free medium with or without propolis compounds. UVA irradiation at doses of 5, 10, 20, and 40 J/cm² was performed using UV Bio-Sun illuminator with a UV peak at 365 nm. Cell irradiation was performed under a thin PBS layer, then PBS was replaced by DMEM; culture medium was collected following 24 h of culture, centrifuged at 5000 g and analyzed by Western blot for MMP-3 determination.

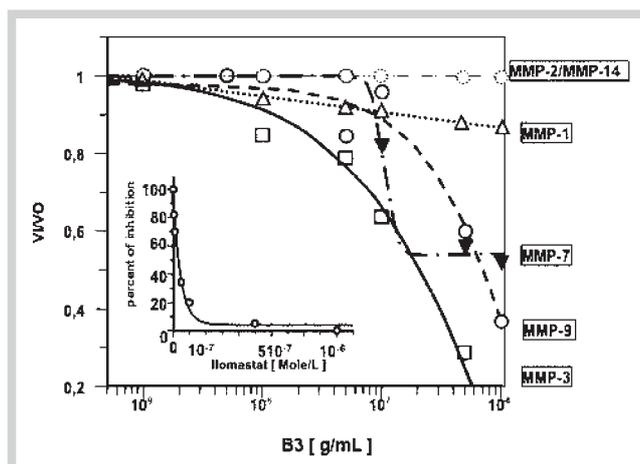


Fig. 2 Inhibition of MMPs activity by B₃ fraction of BuOH extract of propolis from Algeria. abscissa: B₃ concentration g/L (logarithmic scale); ordinate: V_i/V_0 (V_i : rate of substrate hydrolysis in presence of B₃; V_0 : rate of substrate hydrolysis in absence of B₃). Inset: inhibition of MMP-3 by ilomastat (Mole/L).

Supporting information

NMR data of compounds 1–5, the HPLC chromatogram of fraction B₃, and the semipreparative HPLC chromatogram of fraction B₃ are available as Supporting Information.

Results

The crude hydromethanolic extract of propolis from Algeria was partitioned with butanol to yield a butanolic extract, which was fractionated by polyacrylamide chromatography in five fractions (B₁–B₅). MMP-3 inhibitory activity was only detected in the butanolic fraction B₃ (IC₅₀ = 0.15 ± 0.03 μ g/mL) (● Fig. 2). Fraction B₃ also suppressed MMP-9 activity (IC₅₀ = 0.75 μ g/mL) and MMP-7, although complete inhibition of this enzyme was not reached. The fraction B₃ displayed only weak inhibitory capacity towards MMP-1; whereas MMP-2 and MMP-14 activities were not affected whatever the concentration of B₃ used. Ilomastat as a broad spectrum MMP inhibitor, used as a positive inhibitory control, inhibited MMP-3 with IC₅₀ equal to 26 nM. It is now well documented that, *ex-vivo* or *in vivo*, proMMP-3 activation is triggered by the urokinase/plasminogen system and to a lower extent by neutrophil elastase [3, 7]. Fraction B₃ did not affect the activity of either urokinase or neutrophil elastase, whereas potent inhibition of the amidolytic activity of human plasmin by B₃ was observed with IC₅₀ = 0.05 μ g/mL (● Fig. 3). Thus, the influence of B₃ on the activation of proMMP-3 by plasmin was investigated. When proMMP-3 (100 nM) was incubated for 4 h with plasmin (65 nM), >80% of enzyme was activated as shown by Western blotting (● Fig. 3C) where over 80% of pro-MMP-3 (M.W. = 59 kDa) was converted into the lower molecular weight active enzyme form of MMP-3 (M.W. = 45 kDa); such activation was totally suppressed either using aprotinin (10 μ M) as a control or B₃ (1 μ g/mL) (● Fig. 3C).

The purification of fraction B₃ by HPLC yielded five known compounds identified as (+)-chicoric acid (1) [16], (+)-chicoric acid monomethyl ester (2) [16, 17], caffeic acid (3) [18], caftaric acid (4) [19], and caftaric acid 1-methyl ester (5) [17, 19] on the basis of detailed NMR analysis and comparison of NMR, MS, and $[\alpha]_D$ da-

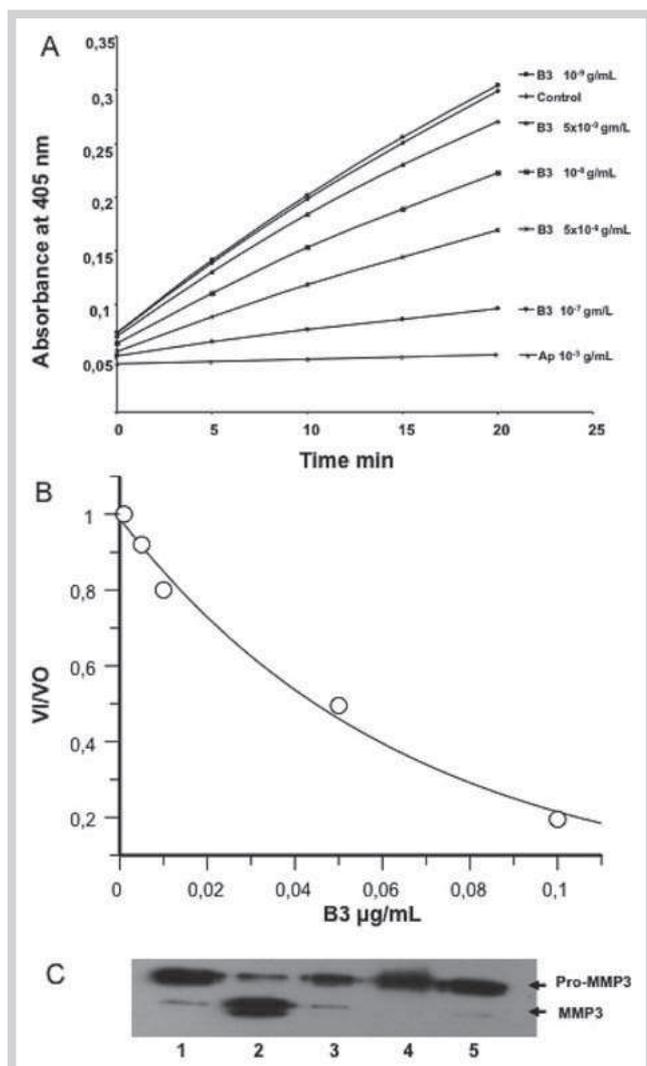


Fig. 3 Influence of B₃ fraction on plasmin activity. **A** 12 nM of plasmin was incubated at 20 °C for 10 min with increasing amounts of B₃ (g/L). Aprotinin (1 mg/mL) was used as a positive inhibitory control. **B** Dose-effect relationship; abscissa: B₃ concentration (logarithmic scale); ordinate: V_i/V_0 . **C** Influence of B₃ on plasmin-mediated proMMP-3 activation (Western blot). Lane 1: proMMP-3 (100 nM); lane 2: proMMP-3 (100 nM) has been incubated with human plasmin (65 nM) for 4 h at 37 °C; lane 3: human plasmin (65 nM) was incubated with B₃ (0.5 µg/mL) for 15 min at 37 °C before addition of pro-MMP-3 (100 nM); lane 4: similar as line 4 with B₃ concentration equal to 1 µg/mL; lane 5: human plasmin (65 nM) was first pre-incubated with aprotinin (50 µM) before adding pro-MMP-3 (10.9 nM). *Note bene*: the position of pro-MMP-3 (59 kDa) and activated enzyme (45 kDa) are indicated.

ta with literature values (● Fig. 1; Figs. 1S and 2S and Table 1S, Supporting Information). These compounds were first evaluated for their inhibitory capacity towards MMP-3 activity. The (+)-chicoric acid (1) and to a lesser extent compound 2 exhibited strong IC towards this enzyme with $IC_{50} = 0.3 \pm 0.05 \mu\text{g/mL} = 6.7 \times 10^{-7} \text{ M}$ (● Fig. 4A) while having no effect on MMP-1 and MMP-2 (not shown). As previously reported, caffeic acid (3) did not inhibit MMP-3. Conversely to fraction B₃, compounds 1 and 2 were unable to inhibit plasmin activity (● Fig. 4B), and caffeic acid (3) only exhibited a partial inhibitory activity (● Fig. 4B). Also, compounds 4 and 5 were unable to interfere with plasmin and MMP activity to any appreciable extent.

Finally, we studied the activity of caffeic acid (3) and chicoric acid derivatives (1) and (2) on MMP-3 expression in UVA irradiated or aged fibroblasts. Human skin fibroblasts were exposed to UVA irradiation and MMP-3 protein expression was determined from cell conditioned media by Western blotting. Consistent with several other investigations, a 10 J/cm² UVA exposure led to a 5-fold upregulation of MMP-3 expression (● Fig. 5A) [23]. When fibroblasts culture medium was supplemented with either B₃ or compounds 2 or 3 before UVA treatment, the level of MMP-3 production dropped, on average, by 40–50% (● Fig. 5B).

Discussion

Caffeic acid as well as its derivatives, i.e., CAPE from propolis, have been previously shown to display antioxidant, anticancer, anti-immunomodulatory, and anti-inflammatory properties [24–27]. Part of their anti-invasive properties during tumor progression could be attributed to their ability to interfere with gelatinases, i.e., MMP-2 and MMP-9 activity [13, 15, 28]. In contrast, these compounds were unable to inhibit several serine and cysteine endopeptidases as well as MMP-1, MMP-3, and MMP-7 [9, 13]. Stromelysin-1, also named MMP-3, occupies a key position in proteolytic cascades leading to collagen and elastin fibers degradation as occurring during cutaneous aging [2]. In keeping with its high proteoglycanase activity, it is also mainly involved in rheumatoid arthritis [29].

To that line, we search for potential MMP-3 inhibitors in a propolis sample from Algeria. A fraction, designated as B₃, from a butanolic extract proved to exhibit potent MMP-3 inhibitory activity ($IC_{50} = 0.15 \mu\text{g/mL}$). Plasmin is considered as the main protease activator of proMMP-3 and, strikingly, B₃ could potentially inhibit plasmin amidolytic activity as well as plasmin-mediated proMMP-3 activation. Also, the fraction B₃ could suppress proMMP-1 activation by MMP-3 (not shown). Therefore, this fraction may act at several levels in the control of the proteolytic cascade involved in dermal collagenolysis with aging.

Five compounds were isolated from B₃ by HPLC: caffeic acid (3), two tartaric acid derivatives: (+)-chicoric acid (1) and its methyl ester (2), not previously identified in propolis, caftaric acid (4) and its 1-methyl ester (5) (● Fig. 1). Caffeic acid was found to display low inhibitory capacity towards plasmin but none of other isolated compounds proved to inhibit this enzyme. In several instances, binding of natural compounds to plasmin kringle domains was described to direct plasmin inhibition [22]. Accordingly, it might be hypothesized that efficient inhibition of plasmin activity by caffeic acid derivatives would necessitate the simultaneous occupancy of several kringle domains by these distinct molecules. As previously reported, caffeic acid was devoid of inhibitory capacity towards MMP-3 [18]. On the contrary, (+)-chicoric acid (1) potently inhibited this enzyme. The concentration of (+)-chicoric acid, chicoric acid monomethylester, and caffeic acid in B₃ were 4.5%, 4%, and 2%, respectively. Caffeic acid did not inhibit MMP-3 and chicoric acid was twice more efficient in inhibiting this enzyme as compared with its methyl ester counterpart. Therefore, since both are present at similar concentrations, (+)-chicoric acid is the major determinant in B₃ for MMP-3 inhibition. The presence of two carboxylate groups in this molecule, which might be involved in the zinc coordination in the MMP-3 active site, is probably important in directing the potency of this compound since the presence of a methyl group in one carboxylate moiety, i.e., compound 2, decreased MMP-3 inhibitory

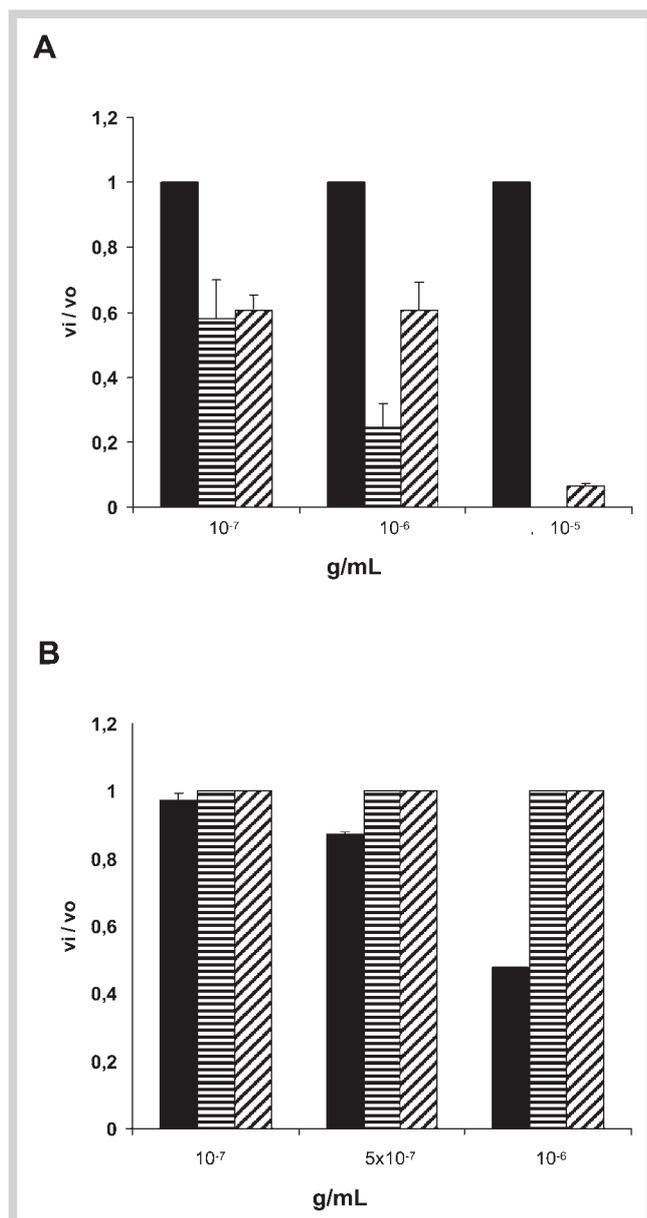


Fig. 4 Influence of (+)-chicoric acid (1), chicoric acid monomethyl ester (2), and caffeic acid (3) on MMP-3 (A) and plasmin (B) activity. The bars indicate SEM values. Aprotinin and ilomastat were used as positive inhibitory controls for plasmin and MMP-3 activity, respectively. ■: caffeic acid (3); ▨: (+)-chicoric acid (1); ▩: chicoric acid monomethyl ester (2) as in g/mL.

activity. It is thus tempting to speculate that (+)-chicoric acid (1) might occupy both primed and unprimed MMP-3 subsites, although further molecular docking studies are required.

Oxidative stress, by triggering NF- κ B and MAPkinase pathways, is the leading cause of MMP upregulation during intrinsic and extrinsic aging [30,31]. In keeping with the well-known antioxidant properties of caffeic acid derivatives, we thus analyzed the ability of fraction B₃ and compounds 1–3 to suppress MMP-3 overexpression by cells exposed to UVA irradiation. In such conditions, caffeic acid (3) as well as chicoric acid monomethyl ester (2) were shown to significantly downregulate enzyme production. Also, these isolated propolis compounds were found to suppress MMP-3 expression in late passaged-fibroblasts (not shown).

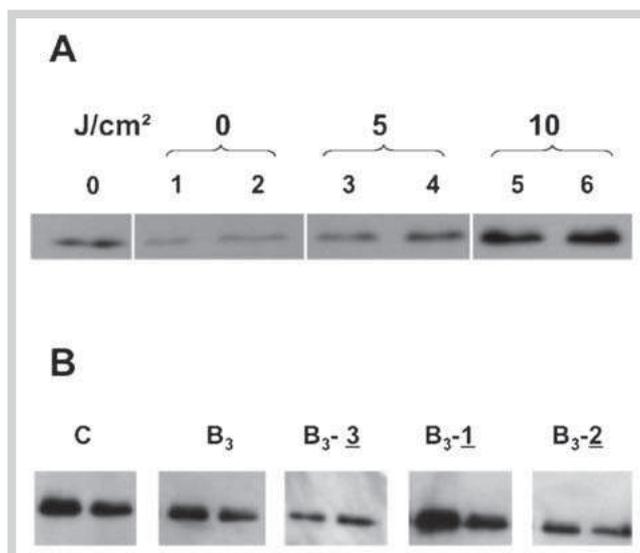


Fig. 5 Inhibition of UVA-mediated MMP-3 expression (Western blotting) in human skin fibroblasts (49 yrs old individual) by caffeic acid derivatives. UVA irradiation (human skin fibroblasts at confluency were used at passage 5): **A** influence of increasing dose of UVA (0, 5, and 10 J/cm²) on MMP-3 expression; **B** cells were incubated with B₃, (+)-chicoric acid (1), chicoric acid monomethyl ester (2), or caffeic acid (3) (1 μ g/mL) before UVA exposure (10 J/cm²). This figure is representative of three distinct experiments.

To conclude, an easily extractable fraction of a propolis sample from Algeria is reported to modulate MMP-3 expression, activation, and activity, making it an attractive candidate as a control agent of the proteolytic cascade involved in several pathological disorders. Strong inhibition of this enzyme by (+)-chicoric acid (1) was observed, and the structure of this compound could ultimately be used as a molecular basis for the development of selective MMP-3 inhibitors as therapeutic agents in cutaneous aging but also in rheumatoid arthritis, periodontitis, and atherosclerosis.

Acknowledgements

▼ This work has been supported by CNRS, University of Reims (URCA) and CPER Champagne-Ardenne in France, and by MESRES in Algeria.

Affiliations

- ¹ Unité Medyc, Université de Reims Champagne Ardennes, UFR de Médecine, Reims, France
- ² Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Reims Champagne Ardennes, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, Reims, France
- ³ Laboratoire des Produits Naturels d'Origine Végétale et de Synthèse Organique, Université Mentouri, Département de Chimie, Constantine, Algérie
- ⁴ Laboratoire de Phytopharmacologie, Université de Jijel, Département de Biologie, Jijel, Algérie

References

- 1 Montagne W, Carlisle K. Structural changes in aging human skin. *J Invest Dermatol* 1979; 73: 47–53
- 2 Fligel SEG, Varani J, Datta SH, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Collagen degradation in aged/photo aged skin *in vivo* and after exposure to MMP-1, *in vitro*. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 842–848
- 3 Antonicelli F, Bellon G, Debelle L, Hornebeck W. Elastin-elastases and inflammation-aging. *Current Top Dev Biol* 2007; 79: 99–155
- 4 Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One* 2008; 3: e4066 [Epub 2008 Dec 30]
- 5 Fisher GJ, Datta SC, Talwar MS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996; 379: 335–339
- 6 Berton A, Godeau G, Emonard H, Baba K, Bellon P, Hornebeck W, Bellon G. Analysis of the *ex vivo* specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. *Matrix Biol* 2000; 19: 139–148
- 7 Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quingley J. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999; 274: 13066–13076
- 8 Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15: 561–571
- 9 Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 347–363
- 10 Siedle B, Hrenn A, Merfort I. A review on natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta Med* 2007; 73: 401–420
- 11 Löser B, Kruse SO, Melzig MF, Nahrstedt A. Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from *Cimifuga racemosa*. *Planta Med* 2000; 66: 751–753
- 12 Jiang B, Wu W, Li M, Xu L, Sun K, Guan S, Liu X, Guo D. Cardioprotection and matrix metalloproteinase-9 regulation of salvianolic acids on myocardial infarction in rats. *Planta Med* 2009; 75: 1286–1292
- 13 Jin UH, Chung TW, Kang SK, Suh SJ, Kim JK, Chung KH, Gu YH, Suzuki I, Kim CH. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clin Chim Acta* 2005; 362: 57–64
- 14 Hwang HJ, Park HJ, Chung HJ, Min HY, Park EJ, Hong JY, Lee SK. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 356–362
- 15 Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JK, Kim CH. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* 2004; 18: 1670–1681
- 16 Veit M, Strack D, Czygan FC, Wray V, Witte L. Di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. *Phytochemistry* 1991; 30: 527–529
- 17 Budzianowski J. Coumarins, caffeoyltartaric acids and their artifactual methyl esters from *Taraxacum officinale* leaves. *Planta Med* 1997; 63: 288–289
- 18 Ibrahim R, Barron D. Phenylpropanoids. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Methods in plant biochemistry, plant phenolics*, Vol. 1. London: Academic Press; 1989: 75–111
- 19 Cheminat A, Zawatzky R, Becker H, Brouillard R. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: Structures and biological activity. *Phytochemistry* 1988; 27: 2787–2794
- 20 Berton A, Rigot V, Huet E, Decarme M, Eeckhout Y, Patthy L, Godeau G, Hornebeck W, Bellon G, Emonard H. Involvement of fibronectin type II repeats in the efficient inhibition of gelatinases A and B by long-chain unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2001; 276: 20458–20465
- 21 Galardy RE, Grobelny D, Foellmer HG, Fernandez LA. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res* 1994; 54: 4715–4718
- 22 Huet E, Cauchard JH, Berton A, Robinet A, Decarme M, Hornebeck W, Bellon G. Inhibition of plasmin-mediated prostromelysin-1 activation by interaction of long chain unsaturated fatty acids with kringle 5. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 643–654
- 23 Petersen MJ, Hansen C, Craig S. Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 440–444
- 24 Nardini M, Leonardi F, Scaccini C, Virgili F. Modulation of ceramides-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cell line: comparison with other antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 722–733
- 25 Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; 26: 83–99
- 26 Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Saiki I, Kadota S. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. *Bioorg Med Chem* 2002; 10: 3351–3359
- 27 Orsolić N, Saranović AB, Basić I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumor activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med* 2006; 72: 20–27
- 28 Bourguet E, Sapi J, Emonard H, Hornebeck W. Control of melanoma invasiveness by anticollagenolytic agents: a reappraisal of an old concept. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 576–579
- 29 Shinozaki M, Inoue E, Nakajima A, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N, Yamanaoka H. Elevation of serum matrix metalloproteinase-3 as a predictive marker for the long-term disability of rheumatoid arthritis patients in a prospective observational cohort IORRA. *Mod Rheumatol* 2007; 17: 403–408
- 30 Nelson KK, Subbaram S, Connor KM, Dasgupta J, Ha FX, Meng TC, Tonks NK, Melendez JA. Redox dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J Biol Chem* 2006; 281: 14100–14110
- 31 Fisher GJ, Quan T, Purohit T, Shao Y, Cho MK, He T, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged skin. *Am J Pathol* 2009; 174: 101–114

الملخص:

البروبوليس هي مادة صمغية تجمعها النحلة من مختلف النباتات. هذه المادة قد استعملت كثيراً كدواء طبيعي. العديد من الأبحاث قد أثبتت الفعالية البيولوجية لهذه المادة. هذه الأبحاث أثارت انتباه العديد من الكيميائيين والبيولوجيين الذين انصب اهتمامهم على المكونات الكيميائية البروبوليس. هذه الأخيرة قد تكون مصدراً جديداً لمركبات كيميائية فعالة بيولوجياً.

في الجزء الأول من بحثنا، قمنا بدراسة مقارنة لبعض بروبوليس الشرق الجزائري من الناحية الكيميائية، مكونات الزيوت الطيارة والفعالية المضادة للبكتيريا. قمنا باختبار المستخلص الكحولي للبروبوليس على عدة عينات بكتيرية معزولة. حدد أصغر تركيز لتثبيط نمو البكتيريا بتخفيف المستخلص الكحولي للبروبوليس في المستحلب البكتيري. النتائج الأولية لبحثنا سمحت لنا باختيار واحدة من البروبوليس المختبرة لدراستها بتعمق. قمنا أولاً بدراسة الفعالية المساعدة على التأم الجروح وذلك باستحداث جرح بـ 100 مم² على ظهر الحيوانات المدروسة.

في المرحلة الثانية لبحثنا، انصب اهتمامنا على دراسة المكونات الكيميائية للبروبوليس الجزائرية. بعد القيام بفصل وتنقية مختلف المستخلصات، قمنا بالتعرف على 16 مركب في حالة نقية منها: 3 أحماض دهنية، 5 مشتقات حمض الكافيك منها 4 ثم فصلها لأول مرة (caftaric acid and its monomethyl ester, chicoric acid and its monomethyl ester) و 8 فلوونيدات منها اثنان (pilosin and ladanein) ثم فصلها لأول مرة. ثم تحديد البنية الكيميائية للمركبات المفصلة باستعمال مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية (NMR- H¹, NMR- C¹³, dept and J-modulé) وثنائية الأبعاد (NOSY, HSQC and HMBC) وكذلك مطيافية الكتلة EI-MS.

في النهاية قمنا باختبار مستخلصات البروبوليس بهدف فصل مركبات قادرة على تثبيط

1- STROMELYSIN (Matrix MetalloProteinase-3 : MMP-3) بصفة خاصة.

هذا الإنزيم بشكل محورياً أساسياً في سلسلتي الكولاجين والإيلاستين التي تؤدي إلى الشيخوخة الباطنية والخارجية.

البروبوليس ثبت النمو البكتيري، مستخلصات البروبوليس خالية من أي فعالية لالتآم الجروح. كسر من المستخلص البيوتانولي مسمى B₃ قام بتثبيط فعالية MMP-3 دون المساس أو مع فعالية ضئيلة لباقي أنزيمات هذه العائلة MMPs. هذا الكسر قام بتثبيط فعالية Plasmin مؤدياً إلى منع تنشيط pro- MMP-3 بواسطة Plasmin.

حمض الكفييك المتواجد بهذا الكسر قام بتثبيط التخليق المتزايد لانزيم MMP-3 في الخلايا الليفية بعد التعرض للأشعة "أ" فوق البنفسجية.

الكلمات المفتاحية:

البروبوليس، الفعالية المضادة للبكتيريا، فعالية التآم الجروح، الفلافونيدات، حمض الكفييك، شينوخوخة جلدية، Stromelysin-1.

Abstract:

Propolis is a natural resinous hive product collected by bees from buds of different trees. It has long been used by humans as a natural remedy, and interest for this product has increased recently. Because of its several biological properties, understanding its chemical composition has attracted research. Bee glue (propolis) has recently become a subject of increasing interest to chemists and biologists and has turned out to be a source of new biologically active compounds. This study investigated the chemical composition and biological activities of Algerian propolis.

In the first part of our study we examined several propolis harvested from Algerian east in order to compare their antibacterial activities, chemical composition and essential oil constituents. Susceptibility tests to ethanolic extracts of propolis (EEP) were performed using bacterial strains isolated from human infections. Dilution of EEP in agar (%v/v) was used for determination of minimal inhibitory concentration. In basis of our preliminary results we investigated one of the tested propolis. First, the wound healing property was studied in complement of the antibacterial activity, using excision wound which was inflicted by cutting away 100 mm² of the skin on the antero-dorsal side of mouse.

In the second part of our study we investigated the chemical composition of Algerian propolis. The separation and purification of propolis extracts lead to the identification of 16 compounds divided in three class: 3 fatty acids, 5 caffeic acid derivatives : four of them (caftaric acid and its monomethyl ester and chicoric acid and its monomethyl ester) are reported for the first time and 8 flavonoids two of them (pilosin and ladanein) are reported for the first time. Structures has been established by spectral analysis including NMR mono (NMR-H¹, NMR-C¹³, dept and J-modulé) and bidimensionelle spectra (NOSY, HSQC, HMBC) and impact electronic mass spectra.

Finally we screened extracts of a propolis at aim to isolate compounds able to selectively inhibit stromelysin-1 (Matrix MetalloProteinase-3: MMP-3). This enzyme occupies a central position in collagenolytic and elastolytic cascades, leading to cutaneous intrinsic and extrinsic aging.

Our propolis showed remarkable inhibitory effect in bacterial growth. The propolis extracts did not exhibit wound healing property. A butanolic extract (B₃) from a propolis was found to potently inhibit MMP-3 activity with no or only weak activity on other MMPs. This fraction also inhibited plasmin amidolytic activity and impeded plasmin-mediated proMMP-3

activation. In addition caffeic acid present in fraction B₃ significantly inhibited MMP-3 surproduction in UVA-irradiated fibroblasts.

Key-words:

Propolis, antibacterial activity, wound healing activity, flavonoids, cafeic acid, skin aging, stromelysin-1.

Résumé :

La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles à partir de différentes plantes. Ce produit a été longtemps utilisé comme remède naturel. De nombreux travaux ont mis en évidence plusieurs activités biologiques de cette substance. Ces travaux ont suscité l'intérêt des chimistes et des biologistes qui s'intéressent de plus près à la composition chimique de la propolis. Cette dernière peut s'avérer une source intéressante de nouveaux produits biologiquement actifs. Notre étude s'intéresse à l'investigation de la composition chimique et des activités biologiques de la propolis algérienne. Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à plusieurs propolis de l'Est algérien. Une étude comparative en fonction de leurs profils chimiques, compositions en huiles essentielles et activité antibactérienne est réalisée. L'extrait éthanolique de propolis (EEP) est testé vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes isolées à partir de prélèvements humains. La concentration minima inhibitrice est déterminée par dilution de l'EEP dans l'agar.

Nos résultats préliminaires nous ont permis de choisir une propolis sur laquelle nous avons réalisé une étude plus approfondie. En premier lieu, nous nous sommes intéressés à l'effet cicatrisant de cette propolis. Cette activité est étudiée en complément de l'activité antibactérienne en réalisant une plaie de 100 mm² sur la partie antéro-dorsale des rats.

Dans la deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la propolis algérienne. Après extraction, séparation et purification nous avons obtenu 16 composés à l'état pur. Ces composés appartiennent à 3 classes de métabolites secondaires : 3 acides gras, 5 dérivés de l'acide caféique dont 4 sont isolés pour la première fois de la propolis (acide caftarique et son monométhyle ester et l'acide chicorique et son monométhyle ester) et 8 flavonoides dont 2 sont rapportés pour la première fois (ladaneine et pilosin). La détermination structurale de ces composés a été réalisée à l'aide des différentes techniques spectroscopiques de RMN mono (RMN-H¹, RMN-C¹³, dept et J-modulé) et bidimensionnelles (NOSY, HSQC, HMBC) ainsi que la spectrométrie de masse EI-MS.

Enfin, les extraits de propolis sont testés dans le but d'isoler des composés susceptibles d'inhiber sélectivement la stromélysine-3 (MétalloProtéinase Matricielle : MMP-3). Cette enzyme occupe une position centrale dans les cascades collagénolytique et élastolytique entraînant le vieillissement intrinsèque et extrinsèque.

Notre propolis inhibe la croissance bactérienne. Les extraits de propolis ne montrent aucune activité cicatrisante. Une fraction de la phase butanolique (B₃) de la propolis inhibe l'activité de la MMP-3 avec très peu d'effet sur les autres MMPs. Cette fraction inhibe

aussi l'activité amidolytique de la plasmine empêchant ainsi l'activation de la pro-MMP-3 via la plasmine. De plus, l'acide caféique présent dans la fraction B₃ inhibe la surproduction de la MMP-3 par les fibroblastes après irradiation aux UV-A.

Mots-clés :

Propolis, activité antibactérienne, activité cicatrisante, flavonoides, acide caféique, vieillissement cutané, stromélysine-1.