



HAL
open science

Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis

Séverine Boisard

► **To cite this version:**

Séverine Boisard. Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis. Sciences pharmaceutiques. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0027 . tel-01611789

HAL Id: tel-01611789

<https://theses.hal.science/tel-01611789>

Submitted on 6 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Séverine BOISARD

Séverine BOISARD

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Végétal Environnement Nutrition Agroalimentaire Mer (VENAM)*

Discipline : *Chimie analytique*

Spécialité : *Pharmacochimie : produits naturels et biosynthétiques*

Unité de recherche : *Laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS)
EA 921, SFR Quasav 149, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé,
16 Boulevard Daviers, 49045 ANGERS Cedex 01*

Soutenue le 10 décembre 2014

Thèse N° : 1426

Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis

JURY

Rapporteurs :	Joël BOUSTIE , Professeur, Université de Rennes I Félix TOMI , Professeur, Université de Corse
Examineurs :	Yves-François POUCHUS , Professeur, Université de Nantes Leslie BOUDESOCQUE-DELAYE , Maître de conférences, Université de Tours
Invité :	Luis Manuel PENA RODRIGUEZ , Chercheur titulaire D, CICY (Mérida, Mexique)
Directeur de Thèse :	Pascal RICHOMME , Professeur, Université d'Angers
Co-encadrante :	Anne-Marie LE RAY , Maître de conférences, Université d'Angers

**L'auteur du présent document
vous autorise à le partager,
reproduire, distribuer et
communiquer selon les conditions
suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.
- Le chapitre IV de ce document est confidentiel, aucune reproduction n'est autorisée.

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



Remerciements

Pour commencer, parce qu'il existe toujours un début à tout, je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Eric Levillain, directeur de recherche au laboratoire Moltech Anjou de l'université d'Angers, de m'avoir donné ma chance alors que tout espoir était quasiment perdu (j'exagère à peine), d'avoir cru en moi, d'avoir veillé sur moi tel un ange gardien et de m'avoir conduite jusqu'à cette thèse. Un grand merci aussi pour sa patience, ses explications sur les statistiques et mes très nombreux dépannages informatiques.

Je voudrais également remercier Laurence Mulon, de la société Mulon-Conseil, consultante pour l'entreprise Ballot-Flurin, d'avoir proposé et choisi le laboratoire SONAS pour la réalisation de cette collaboration scientifique et sans qui celle-ci n'aurait pu avoir lieu.

Je remercie sincèrement le Pr. Pascal Richomme, mon directeur de thèse, de m'avoir choisie pour cette thèse et d'avoir déjoué les difficultés d'ordre administratif qui se sont présentées en amont, me permettant ainsi de m'orienter vers un domaine qui me plait tout particulièrement : la chimie des produits naturels. Je le remercie ainsi de m'avoir accueillie au sein du laboratoire SONAS et de m'avoir guidée durant ces trois années, merci pour ses précieux conseils, pour la confiance accordée et la liberté qu'il m'a laissée pour la réalisation de ce projet. Je le remercie également de m'avoir donné l'opportunité de participer au congrès international 10^e RIIPN au Mexique et pour tous les moments partagés dans ce beau pays.

Je remercie également très chaleureusement le Dr. Anne-Marie Le Ray, ma co-encadrante pour sa gentillesse, sa bonne humeur mais également pour sa rigueur et ses connaissances pointues dans le domaine de la pharmacologie. Merci pour sa présence dans les moments plus difficiles et pour son soutien et ses encouragements sans faille au long de ces trois années. Merci aussi pour les très bons moments et les fous rires inoubliables lors de notre séjour au Mexique.

Je remercie Catherine Flurin, PDG de Ballot-Flurin Apiculteurs (Abeilles Santé) pour le financement de cette thèse et de m'avoir ainsi permis d'acquérir cette "expertise" sur la propolis. Je la remercie aussi pour la confiance qu'elle m'a exprimée durant ces trois années, pour nos discussions très intéressantes au sujet des abeilles et de son entreprise, et pour m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux de recherche à deux congrès Apimondia, d'abord en Chine en 2012 puis en Ukraine en 2013. Un grand merci également à toute l'équipe de Ballot-Flurin pour leur accueil chaleureux lors de mes visites dans les Pyrénées, et plus particulièrement à Isabelle Péruchès, Rémi Ballot, Claire Levesque, Evelyne Tastet, Sabine Pech, Elsa Richard et bien d'autres... Merci aussi à Pascal Flurin pour tous les moments cocasses passés dans la capitale ukrainienne et nos "désaccords" dans le métro...

Je voudrais sincèrement remercier tous les membres du jury : tout d'abord, le Pr. Joël Boustie (Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Rennes I) et le Pr. Félix Tomi (CNRS/Université de Corse) qui me font l'honneur et le plaisir d'être rapporteurs de mon travail de thèse, puis le Pr. Yves-François Pouchus (Université de Nantes) et le Dr. Leslie Boudesocque-Delaye (Université de Tours) qui ont accepté de juger mes travaux en qualité d'examineurs, et enfin le Dr. Luis Manuel Peña Rodriguez (CICY, Mexique) pour sa participation à ce jury de thèse en tant que membre invité.

Je remercie également le Pr. Sophie Tomasi, de la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'université de Rennes I, ainsi que le Dr. Eric Levillain, du laboratoire Moltech Anjou, d'avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse et ainsi d'avoir évalué mon travail au cours de ces trois ans et de m'avoir conseillée sur les directions à prendre ou à poursuivre.

Je tiens à remercier tous les collègues du laboratoire SONAS pour leur participation et sans qui je n'aurais pu obtenir tous ces résultats. Tout d'abord, je remercie Marie Lavault pour m'avoir initiée à l'analyse pollinique et d'avoir partagé avec moi ses connaissances très étendues dans ce domaine. Merci à Julia Gatto, Marie-Christine Aumond et Dimitri Bréard pour la réalisation des tests antioxydants DPPH et ORAC, merci également à Patricia Blanchard pour celle des tests anti-AGEs mais aussi pour les démarches administratives qui se sont révélées plus ou moins compliquées... Je remercie également le Dr. Séverine Derbré pour ses informations et explications sur l'activité anti-AGEs. Je remercie le Dr. Anne Landreau de m'avoir formée sur la réalisation des tests antifongiques et plus particulièrement sur la méthode de microdilution, et je remercie également le Pr. Jean-Philippe Bouchara, directeur du laboratoire GEIHP, de m'avoir permis de manipuler au sein de son laboratoire.

D'autres personnes, en dehors du laboratoire, m'ont également aidé et ont participé à cette thèse. Je remercie le Dr. Marie Kempf et Vivane Cassisa du GEIHP pour la réalisation des tests antibactériens. Merci également à Benjamin Siegler et au Dr. Ingrid Freuze de la PIAM, respectivement pour mes nombreuses analyses de RMN et de MS et LC/MS. Je remercie aussi deux personnes du laboratoire Moltech Anjou : Magali Allain pour l'utilisation du polarimètre et le Dr. Christelle Gautier pour celle du spectrophotomètre IR. Je remercie également le Dr. Patrick Saulnier ainsi que le Dr. Frédéric de Nardi pour leur aide en statistique.

Nos partenariats ont même dépassé nos frontières...

J'exprime mes sincères remerciements au Dr. Luis Manuel Peña Rodriguez, chercheur au CICY à Mérida, Mexique, qui a réalisé plusieurs séjours au sein du laboratoire SONAS, pour sa bonne humeur quotidienne, sa gentillesse et ses conseils. Je le remercie de m'avoir fourni un échantillon d'une propolis mexicaine et pour notre collaboration sur l'étude phytochimique de celle-ci. Je le remercie également de m'avoir entraînée à parler anglais et espagnol et donc pour sa patience (car il en fallait beaucoup !). Un grand merci notamment pour le fabuleux programme de découverte de la péninsule du Yucatán lors de notre séjour au

Mexique : Playa del Carmen, Tulum, Xel-Ha, Cancún, Chitchén Itzá, Mérida, Chelem, Uxmal et j'en passe... et surtout les baignades dans les cenotes... (On y retourne quand ?). Je remercie aussi Fabiola Escalante-Erosa, du CICY également, pour la réalisation des analyses GC/MS et Luis Ignacio Hernández-Chavez, de l'institut supérieur Felipe Carillo Puerto pour le partage de ses connaissances sur la flore du Quintana Roo.

Je remercie Tiédé Manuel Ouloto et plus particulièrement le Dr. Bruno Marcel Iritié, de l'Institut National Polytechnique Felix Houphouet Boigny (INPHB) à Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, rencontrés lors du congrès Apimondia en Ukraine en 2013, de m'avoir fourni un échantillon d'une propolis de Côte d'Ivoire. Je remercie également Margaret R.A. Ogaba, directrice générale de JLLIMA Holdings Limited située à Kitgum au Nord de l'Ouganda, rencontrée lors du même congrès, pour son échantillon d'une propolis ougandaise.

Je remercie tous les autres membres du laboratoire SONAS, les Dr. Isabelle Baglin, Pr. Denis Séraphin, Dr. Jean-Jacques Hélesbeux pour leur sympathie, leur convivialité et tous leurs bons conseils. Merci également aux Dr. Sabine Mallet et Dr. David Guilet ainsi que Yannick Abatuci pour tout le soutien et toute l'expérience qu'ils m'apportent dans le cadre de mon poste d'ATER actuel. Je remercie aussi le Dr. Andreas Schinkovitz pour sa bienveillance quotidienne, pour les moments inoubliables partagés au Mexique et pour mon approvisionnement en chocolat pendant la phase finale de rédaction de cette thèse. Merci aussi à tous les thésards et stagiaires qui ont été ou sont présents et qui ont contribué à leur façon, en y assurant une très bonne ambiance, au bon déroulement de cette thèse. Je pense à Sylvie, Ghislain, Luc, Cindy, Alexandre, Tai, Khaled, Ali, Paul, Amel, Jonathan et Landy et surtout à mes collègues de bureau, Stéphane et Caroline, qui doivent me supporter tous les jours (ou presque !) avec une mention spéciale pour Caroline, que je remercie beaucoup pour sa gentillesse, sa patience, sa joie de vivre, et pour tous ces moments qu'on a partagés, pour ses avis, ses conseils, nos anecdotes et nos fous rires.

Je n'oublie pas non plus mes stagiaires Line, Tho, Alexiane et Victor pour leur implication et leur contribution à mon travail de thèse, et pour les très bons résultats obtenus ! J'ai vraiment eu plaisir à partager mon projet de thèse avec eux.

Enfin, je remercie ma famille, tout d'abord, mes parents et mon frère qui m'ont toujours soutenue dans tout ce que j'ai entrepris, et qui m'ont permis d'arriver là où je suis actuellement. Merci à Yaya, ma moitié, de m'avoir encouragée et supportée pendant cette thèse et surtout ces derniers mois. Merci à mes enfants Maeva et Jérémy qui, même si ce n'est pas de tout repos tous les jours, me comblent de bonheur. Merci aussi à mes fidèles amies, Sophie et Bénédicte, qui sont toujours là pour moi et qui n'ont cessé de m'encourager.

Merci à tous...

Production scientifique

Publications

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Gatto, J.; Aumond, M.-C.; Blanchard, P.; Derbré, S.; Flurin, C.; Richomme, P. Chemical Composition, Antioxidant and Anti-AGEs Activities of a French Poplar Type Propolis. *Journal Agricultural Food Chemistry* **2014**, *62*, 1344–1351.

Boisard, S.; Huynh, T. H. T.; Escalante-Erosa, F.; Hernández-Chavez, L. I.; Peña-Rodríguez, L. M.; Richomme, P. Unusual Chemical Composition of a Mexican Propolis Collected in Quintana Roo, Mexico. *Journal of Apicultural Research* (Acceptée le 23/07/2014, référence JAR1410AA).

En préparation

Séverine Boisard, Anne-Marie Le Ray, Anne Landreau, Marie Kempf, Viviane Cassisa, Catherine Flurin, Pascal Richomme. Synergistic antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*

Communications orales

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Aumond, M.-C.; Blanchard, P.; Derbré, S.; Flurin, C.; Richomme, P. *Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French propolis*
10^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, 21-24 mai **2014**, Mérida, Yucatán, Mexique

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Aumond, M.-C.; Péruchès I.; Flurin, C.; Richomme, P. *Chemical Composition and Antioxidant Activity of French BFA Propolis extracts*
Apimondia XXXXIII International Apicultural Congress, 29 sept-04 oct **2013**, Kiev, Ukraine

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Aumond, M.-C.; Blanchard, P.; Derbré, S.; Flurin, C.; Richomme, P. *Caractérisation chimique et évaluation des activités antioxydante et anti-AGEs d'extraits de propolis française*
Journée des doctorants de la SFR QUASAV (Qualité et santé du végétal) 6^{ème} édition, 28 novembre **2013**, Angers, France (1^{er} prix *ex aequo* de la meilleure présentation)

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Gatto, J.; Aumond, M.-C.; Landreau, A.; Kempf, M.; Péruchès I.; Flurin, C.; Richomme, P. *Polyphenolic content and Pharmacological Potential of French BFA Propolis extracts (2)*
Apimondia Apimeditica-Apiquality International Forum, 22-25 octobre **2012**, Zhenjiang, Chine

Posters

Boisard, S.; Huynh, T. H. T.; Escalante-Erosa, F.; Hernández-Chavez, L. I.; Peña-Rodríguez, L. M.; Richomme, P. *Unusual chemical composition of a Mexican propolis collected in Quintana Roo, Mexico*

10^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, 21-24 mai **2014**, Mérida, Yucatán, Mexique

Boisard, S.; Huynh, T. H. T.; Landreau, A.; Kempf, M.; Escalante-Erosa, F.; Peña-Rodríguez, L. M.; Hernández-Chavez, L. I.; Richomme, P. *Unusual Chemical Composition of a Mexican Propolis Collected in Yucatán*

Apimondia XXXXIII International Apicultural Congress, 29 sept-04 oct **2013**, Kiev, Ukraine

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Aumond, M.-C.; Blanchard, P.; Derbré, S.; Péruchès I.; Flurin, C.; Richomme, P. *Chemical Composition, Antioxidant and Antiglycoxidant Activities of French BFA Propolis extracts*

Trends in natural products research: a young scientists meeting of PSE and ÖPhG, 21-25 juillet **2013**, Obergurgl, Autriche

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Péruchès I.; Flurin, C.; Richomme, P. *Caractérisation et valorisation biologique d'extraits de propolis*

12^{ème} Forum des doctorants, 30 mai **2013**, Angers, France

Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Gatto, J.; Aumond, M.-C.; Landreau, A.; Kempf, M.; Péruchès I.; Flurin, C.; Richomme, P. *Polyphenolic content and Pharmacological Potential of French BFA propolis extracts (I)*

IOCD International Conference of Functional Molecules in Nature, 22-24 septembre **2012**, Nanjing, Chine

Table des matières

Remerciements.....	v
Production scientifique.....	ix
Table des matières.....	xi
Table des figures.....	xix
Table des tableaux.....	xxvii
Table des annexes.....	xxxii
Abbréviations et acronymes.....	xxxiii
INTRODUCTION.....	1
Bibliographie de l'introduction (1-16).....	7
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1. Un peu d'histoire.....	11
2. Procédés d'extraction.....	11
2.1. Solvants d'extraction.....	12
2.2. Proportion en propolis.....	12
2.3. Durée et température d'extraction.....	12
2.4. Traitement.....	13
2.5. Conservation.....	13
3. Techniques d'analyse et de caractérisation.....	13
3.1. Dosages spectrophotométriques.....	13
3.1.1. Dosages des polyphénols totaux.....	13
3.1.2. Dosage des flavonoïdes.....	14
a) Dosage des flavones/flavonols.....	14
b) Dosage des flavanones/dihydroflavonols.....	14
3.2. Techniques séparatives.....	15
3.2.1. Techniques de chromatographie.....	15
a) Chromatographie sur colonne.....	15
b) Chromatographie sur couche mince.....	15
c) Chromatographie gazeuse.....	15
d) Chromatographie liquide haute performance.....	16
3.2.2. Autre technique employée.....	16
3.3. Techniques d'identification.....	16
3.3.1. Spectrométrie de masse en injection directe.....	16
3.3.2. Résonance magnétique nucléaire.....	17
4. Diversité chimique et origine botanique de la propolis.....	18
4.1. Variabilité de la propolis.....	18
4.2. Composition chimique et source végétale.....	18
4.3. Vers une standardisation ?.....	27
5. Activités biologiques associées à la propolis.....	29
5.1. Activité antioxydante.....	29
5.2. Activité antifongique.....	29
5.3. Activité antibactérienne.....	30
5.4. Activité antivirale.....	30

5.5.	Activité anti-inflammatoire	30
5.6.	Activité immunomodulatrice	31
5.7.	Activité antitumorale	31
5.8.	Autres activités	32
5.9.	Effets indésirables – toxicité	32
	Bibliographie du chapitre I (17-176)	33

CHAPITRE II : CARACTERISATION CHIMIQUE..... 43

1.	Echantillon de propolis	45
1.1.	Matière première	45
1.2.	Préparation	46
1.2.1.	Triage des impuretés	46
1.2.2.	Cryobroyage.....	46
2.	Extractions.....	47
2.1.	Macérations alcooliques simples	47
2.2.	Extractions successives	48
2.3.	Comparaison des rendements d'extraction	49
3.	Profils chromatographiques.....	49
3.1.	Extraits alcooliques	50
3.2.	Extraits multiples.....	51
3.2.1.	Avec solvants de polarité croissante (E04)	51
3.2.2.	Extraits type Ballot-Flurin (E05)	52
3.2.3.	Extraits DCM E06-2 et E07-3 et mixte : DCM/ MeOH/ H ₂ O (E08-2)	52
4.	Dosages spectrophotométriques	53
4.1.	Dosage des polyphénols totaux	54
4.1.1.	Principe	54
4.1.2.	Taux de polyphénols totaux des différents extraits	54
4.2.	Dosages des flavonoïdes	55
4.2.1.	Dosage des flavones/ flavonols.....	55
4.2.2.	Dosage des flavanones/ dihydroflavonols.....	55
4.2.3.	Taux de flavones/ flavonols et flavanones/ dihydroflavonols des différents extraits	56
5.	Identification des composés.....	58
5.1.	Etude déréplicative	58
5.1.1.	Définition	58
5.1.2.	Identification des premiers composés.....	58
	a) Exemple d'identification n°1 : l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (11) (déréplication)	59
	b) Exemple d'identification n°2 : la chrysine (34) (déréplication + témoin)	61
5.2.	Identification structurale.....	62
5.2.1.	Composés déjà connus	62
	a) Fraction CF2-2 (composé 47)	62
	b) Fraction CF2-17 (composé 31)	64
	c) Fraction CF2-19 (composés 9 et 13)	65
	d) Fraction CF2-6 (composés 10, 26, 37 et 38)	67
	e) Fraction CF2-8 (composés 14, 29 et 44).....	70
	f) Fraction CF2-13 (composés 1, 2, 16 et 32).....	72
	g) Fraction CF2-7 (composés 12, 35, 36 et 45)	74
	h) Fraction CF2-10 (composés 28 et 30).....	77
	i) Fraction CF2-9 (composés 3, 5, 6, 17, 25, 39 et 40).....	79
	j) Fraction CF2-11 (composés 15, 18, 27, 33 et 42).....	84
	k) Fraction CF2-5 (composé 48)	86
	l) Fraction CF2-4 (composé 46)	87
	m) Fraction CF2-1 (composés 49-52)	88
	n) Fraction CF2-20 (composés 20-22)	91
	o) Fraction CF2-15 (composé 24)	92
	p) Extrait DCM E09-2 (composés 19 et 23)	93
5.2.2.	Composés nouveaux	94

a)	Composé 41 : dérivé de la pinocembrine	94
b)	Composé 43 : dérivé de la catéchine	98
5.2.3.	Chromatogrammes récapitulatifs	101
5.3.	Quantification	103
5.3.1.	Quantification des 12 marqueurs par HPLC/ DAD	103
a)	Principe	103
b)	Optimisation de la méthode HPLC	104
c)	Quantification des douze marqueurs dans les extraits	105
5.3.2.	Quantification des autres constituants de l'extrait DCM	106
6.	Conclusion	107
7.	Partie expérimentale	108
7.1.	Réactifs et standards	108
7.2.	Instrumentation	108
7.3.	Extractions	109
7.3.1.	Premières macérations alcooliques (E01 et E02)	109
7.3.2.	Macération éthanolique (EEP : E03)	109
7.3.3.	Extractions successives	109
a)	Extraction par le cyclohexane (E04-1, E07-1, E08-1)	109
b)	Extractions par le DCM (E04-2, E06-2, E07-3), AcOEt, MeOH (E04-3 et 4), EtOH 90% (E05-2), DCM/MeOH/H ₂ O (E08-2)	109
c)	Extraction aqueuse (E05-1, E06-1, E07-2)	109
7.4.	Analyses HPLC	110
7.4.1.	Préparation des échantillons	110
7.4.2.	Analyses HPLC/ DAD (méthode 1)	110
7.4.3.	Analyses HPLC/ UV/ MSⁿ	110
7.5.	Dosages spectrophotométriques	110
7.5.1.	Polyphénols totaux	110
7.5.2.	Flavones/ flavonols	112
7.5.3.	Flavanones/ dihydroflavonols	113
7.6.	Fractionnements et purifications	114
7.6.1.	Chromatographie Flash de l'extrait DCM (CF2)	114
a)	Extraction dichlorométhanique de 50 g de propolis (E09)	114
b)	Préparation du dépôt solide	115
c)	Fractionnement	115
7.6.2.	Purifications des fractions par chromatographie Flash	116
a)	CF3.CF2-18	117
b)	CF4.CF2-19	117
c)	CF5.CF2-6	117
d)	CF6.CF2-8	117
e)	CF7.CF2-13	117
f)	CF8.CF2-7	118
g)	CF9.CF2-9	118
h)	CF10.CF2-11	118
i)	CF11.CF2-1	119
j)	CF12.CF2-20	119
7.6.3.	Essai de purification par HPLC préparative	119
7.7.	Quantification des douze marqueurs par HPLC/ DAD	120
7.7.1.	Procédure HPLC/ DAD optimisée (méthode 2)	120
7.7.2.	Droites d'étalonnage	120
7.8.	Détection HPLC/ UV du dérivé de la catéchine	121
	Bibliographie du chapitre II (177-202)	123

CHAPITRE III : VALORISATION BIOLOGIQUE	125
1. Activités antioxydantes et anti-AGEs	127
1.1. Activité antioxydante	127
1.1.1. Méthode DPPH	127
a) Principe	127
b) Activité antioxydante DPPH des extraits de propolis	128
1.1.2. Méthode ORAC	129
a) Principe	129
b) Activité antioxydante ORAC des extraits de propolis	130
1.1.3. Relations composition-activité antioxydante	131
a) Relation taux de polyphénols totaux-activité antioxydante	131
b) Relation composition-activité antioxydante	132
c) Relation structure-activité antioxydante	133
1.2. Activité anti-AGEs	136
1.2.1. Généralités	136
a) Formation des AGEs	136
b) Potentiel anti-AGEs et antioxydant : action antiglycoxydante	138
1.2.2. Principe du test	138
1.2.3. Activité anti-AGEs des extraits de propolis	139
1.2.4. Fractionnement bioguidé	140
1.2.5. Identification des composés anti-AGEs actifs	142
1.2.6. Relation composition-activité anti-AGEs	142
a) Relation antioxydant-anti-AGEs	143
b) Relation structure-activité chélation métaux de transition	144
c) Relation structure-activité anti-dicarbonylés	145
1.3. Conclusion	149
2. Activités antifongiques et antibactériennes	151
2.1. Activité antifongique	151
2.1.1. Souches testées	151
2.1.2. Premier test : diffusion solide	152
2.1.3. Activité antifongique des extraits : microdilution	152
2.2. Activité antibactérienne	153
2.2.1. Souches testées	153
a) Souches Gram(-)	153
b) Souches Gram(+)	154
2.2.2. Activité antibactérienne des extraits de propolis	155
2.3. Relations composition-activité antimicrobienne	158
2.3.1. Relation taux de PT et FT-activité antimicrobienne	158
2.3.2. Relation taux cumulé des 12 marqueurs-activité antimicrobienne	158
2.3.3. Activités antimicrobiennes des cinq constituants majoritaires	158
2.4. Effets synergiques des constituants de la propolis	159
2.5. Conclusion	161
3. Partie expérimentale	162
3.1. Réactifs	162
3.2. Activité antioxydante	162
3.2.1. Méthode DPPH	162
3.2.2. Méthode ORAC	163
3.3. Activité anti-AGEs	163
3.4. Activité antifongique	164
3.5. Activité antibactérienne	165
Bibliographie du chapitre III (203-257)	167

CHAPITRE IV : ETUDES COMPLEMENTAIRES (CONFIDENTIEL)	171
1. Variabilité des 24 lots de propolis	173
1.1. Origine géographique des différents lots	173
1.2. Etude préliminaire : analyse pollinique	174
1.3. Variabilité aux niveaux composition chimique et activités biologiques	176
1.3.1. Variabilité de la composition chimique	177
a) Rendement d'extraction	177
b) Taux de polyphénols totaux et des deux classes de flavonoïdes	178
c) Taux cumulé des 12 marqueurs	181
1.3.2. Variabilité des activités biologiques	182
a) Activité AO DPPH	182
b) Activité anti-AGEs	183
1.3.3. Caractéristiques de la propolis de Ballot-Flurin	184
1.3.4. Analyse de variance	185
1.3.5. Relation composition-activité/ zone géographique	187
a) Zone Grand Ouest	188
b) Zones Sud-Ouest/Sud-Est	189
c) Zones Montagne/Plaine Méditerranée	191
1.4. Conclusion	195
2. Optimisation de l'extraction aqueuse	196
2.1. Etude comparative préliminaire des extraits aqueux	196
2.1.1. Conditions opératoires des extractions aqueuses	196
2.1.2. Comparaison des résultats des trois extraits aqueux	197
a) Aspect du filtrat et rendement d'extraction	197
b) Composition chimique : quantification de sept marqueurs	198
c) Taux de polyphénols totaux et activité antioxydante DPPH	200
2.1.3. Premières propositions d'amélioration des procédés d'extraction aqueuse	201
2.2. Optimisation de l'extraction aqueuse par plan d'expériences	202
2.2.1. Méthodologie des plans d'expériences	203
a) Définition	203
b) Terminologie	203
c) Interprétation des résultats d'un plan d'expériences	207
2.2.2. Facteurs et réponses du plan d'expériences de l'extraction aqueuse (plan EA)	211
2.2.3. Résultats du plan d'expériences de l'extraction aqueuse	212
a) Rendement d'extraction	212
b) Taux de polyphénols totaux (Folin-Ciocalteu)	216
c) Indice AO (HPLC)	218
2.2.4. Bilan du plan d'expériences de l'extraction aqueuse	220
2.3. Extraction à l'eau subcritique	221
2.3.1. Principe	221
2.3.2. Bibliographie existante	222
2.3.3. Essai préliminaire	223
a) Extraction	223
b) Rendement	223
c) Profil HPLC	223
d) Partition liquide-liquide	224
e) Taux de polyphénols totaux et de flavonoïdes	225
2.3.4. Plan d'expériences de l'extraction par l'eau subcritique (plan EAS)	226
a) Facteurs et réponses choisies (plan EAS)	226
b) Résultats (plan EAS)	227
c) Analyse des résultats (plan EAS)	228
d) Bilan du plan d'expériences de l'extraction par l'eau subcritique	232
e) Comparaison des deux plans d'expériences (plans EA vs EAS)	232
f) Taux de flavonoïdes (HPLC)	235
2.4. Conclusion	237
3. Partie expérimentale	237
3.1. Analyse pollinique	237

3.1.1.	Préparation des échantillons	237
3.1.2.	Analyse des échantillons au microscope	237
3.2.	Analyses statistiques	238
3.3.	Optimisation de l'extraction aqueuse	238
3.3.1.	Extraction aqueuse classique	238
	a) Etude comparative préliminaire	238
	b) Extraction - Plan d'expériences	238
3.3.2.	Extraction par l'eau subcritique	238
	a) Appareillage	238
	b) Mode opératoire	239
	c) Partition liquide-liquide de SUB01	240
3.3.3.	Dosage des polyphénols totaux	240
3.3.4.	Quantification HPLC	240
	a) Quantification des sept marqueurs (Etude comparative préliminaire)	240
	b) Plan d'expériences	241
	Bibliographie du chapitre IV (258-272)	243

CHAPITRE V : PROPOLIS DU MONDE 245

1.	Echantillons de propolis	247
1.1.	Propolis mexicaine (MEX)	247
1.2.	Propolis ivoirienne (CI V)	247
1.3.	Propolis ougandaise (OUG)	247
2.	Bibliographie disponible	248
2.1.	Propolis mexicaine	248
2.2.	Propolis ivoirienne	248
2.3.	Propolis ougandaise	248
3.	Compositions chimiques	249
3.1.	Extractions	249
3.1.1.	Extractions éthanoliques	249
3.1.2.	Extractions successives	250
3.2.	Dosages des polyphénols totaux	251
3.3.	Profils chromatographiques	251
3.3.1.	Chromatographie sur couche mince	251
3.3.2.	HPLC/ DAD	252
3.4.	Identification des constituants majoritaires	252
3.4.1.	Propolis mexicaine	252
	a) Fractionnement par Chromatographie Flash	252
	b) Analyses RMN	253
	c) Analyses GC/MS	254
	d) Composition chimique inhabituelle	255
	e) Source botanique probable	256
3.4.2.	Propolis ivoirienne	257
	a) Analyse HPLC/DAD (méthode 2)	257
	b) Source botanique probable	258
3.4.3.	Propolis ougandaise	260
	a) Extrait OUG-DCM	261
	b) Extrait OUG-MeOH	269
	c) Récapitulatif des cinq molécules identifiées (OUG-7 à 11) après purification	276
	d) Source botanique probable	277
4.	Activités biologiques	278
4.1.	Activités antioxydante et anti-AGEs	278
4.1.1.	Résultats	278
4.1.2.	Discussion	279
4.2.	Activités antifongique et antibactérienne	279
4.2.1.	Résultats	279
4.2.2.	Discussion	280

5.	Conclusion	280
6.	Partie expérimentale	281
6.1.	Extractions	281
6.1.1.	Extractions éthanoliques de propolis (EEP)	281
6.1.2.	Extractions successives	281
	a) Pour 1 g de propolis brute.....	281
	b) Pour 25 g de propolis brute (OUG)	281
6.2.	Dosages et analyses chromatographiques	282
6.2.1.	Dosages des polyphénols totaux	282
6.2.2.	Analyses CCM	282
6.2.3.	Analyses HPLC/ DAD (méthode 1)	282
6.2.4.	Analyses HPLC/ DAD/ MS	282
6.2.5.	Analyses HPLC/ DAD et quantification des 12 marqueurs (méthode 2)	282
6.2.6.	Analyses HPLC/ DAD/ MS de la propolis ougandaise (méthode 3)	282
6.2.7.	Analyses HPLC/ DAD de l'extrait OUG-MeOH (méthode 4)	282
6.2.8.	Analyses GC/ MS	282
6.2.9.	Analyse MS/ ionisation chimique	283
6.3.	Purifications par chromatographie Flash	283
6.3.1.	CF13_MEX-EEP	283
6.3.2.	CF14_OUG-DCM	283
6.3.3.	CF15_OUG-MeOH	283
6.4.	Activités biologiques	284
	Bibliographie du chapitre V (273-324)	285

CONCLUSION GENERALE	289
----------------------------------	------------

Bibliographie de la conclusion générale (325)	295
--	------------

BI BL IOGRAPHI E GENERALE	297
--	------------

ANNEXES	315
----------------------	------------

PUBLICATIONS	389
---------------------------	------------

Table des figures

Chapitre I

Figure I-1. Peuplier noir (<i>Populus nigra</i>)	19
Figure I-2. "Alecrim-do-campo" (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	19
Figure I-3. Fleur de <i>Clusia</i> (<i>Clusia rosea</i>)	20
Figure I-4. <i>Macaranga tanarius</i>	20
Figure I-5. Exemple de Cupressaceae.....	21
Figure I-6. Distribution géographique des cinq types de propolis.....	22
Figure I-7. Nouveaux flavonoïdes de la propolis de type peuplier (Type I).....	25
Figure I-8. Nouveaux dérivés de l'artépilline C isolés de la propolis verte du Brésil (Type II).....	25
Figure I-9. Nouvelles benzophénones polyprénylées isolées de propolis tropicale (Type III).....	26
Figure I-10. Flavanones (17-18) et stilbène géranylés (19) des propolis de type IV	26
Figure I-11. Néoflavonoïdes et isoflavonoïdes provenant de propolis népalaise et brésilienne.....	27

Chapitre II

Figure II-1. Sites de collectes des lots de propolis et localisation de l'entreprise BFA.....	45
Figure II-2. Mélange de propolis comprenant de la propolis marron, rouge, noire et beige-verte	46
Figure II-3. Impuretés présentes dans les 200 g de propolis reçus.....	46
Figure II-4. Avant et après cryobroyage	47
Figure II-5. Rendements des différentes extractions	49
Figure II-6. Profils chromatographiques des extraits alcooliques E01, E02 et E03 (λ 280 nm, méthode 1)..	50
Figure II-7. Profils chromatographiques, présentés à la même échelle, des extraits E04-1 à 4 (λ 280 nm, méthode 1)	51
Figure II-8. Profils chromatographiques des extraits E05-1 et 2 (λ 280 nm, méthode 1)	52
Figure II-9. Profils chromatographiques des extraits E06-2, E07-3 et E08-2 (λ 280 nm, méthode 1)	53
Figure II-10. Taux de polyphénols totaux des extraits E01 à E08	54
Figure II-11. Complexes stables des flavonols et flavones avec $AlCl_3$	55
Figure II-12. Réaction d'une cétone avec la DNP	55
Figure II-13. Taux arrondis de FF et de FD des différents extraits de propolis (n=3)	56
Figure II-14. Premiers composés identifiés par déréplication et comparaison avec témoins commerciaux...	58
Figure II-15. Chromatogramme HPLC de E01 regroupant les courants ioniques totaux (TIC) et les absorbances enregistrées à 254 et 280 nm	59
Figure II-16. Spectres de masse en mode négatif et positif du composé 11.....	59
Figure II-17. Spectres UV du composé 11 et des acides caféique et férulique	60
Figure II-18. Structure de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (11).....	60

Figure II-19. Chromatogramme HPLC de E01 regroupant les courants ioniques totaux (TIC) et les absorbances enregistrées à 254 et 280 nm	61
Figure II-20. Spectre de masse ESI (-MS) du composé 34 et son spectre UV (pic y)	61
Figure II-21. Spectre de masse ESI (-MS) de la chryisine commerciale et son spectre UV	61
Figure II-22. Structure de la chryisine (34)	62
Figure II-23. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-2 et profil UV du composé 47.....	62
Figure II-24. Structure de la pinostrobinine (47)	63
Figure II-25. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-17 et profil UV du composé 31	64
Figure II-26. Spectre RMN ¹ H (zone δ 4.1-7.9 ppm) du composé 31 (270 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ _{TMS} 0 ppm)	64
Figure II-27. Structure du 2-acétyl-1,3-di-(E)-coumaroylglycérol (31).....	65
Figure II-28. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-19 et profils UV des composés 9 et 13.....	65
Figure II-29. Structure de l'acide isoféruleique (9)	66
Figure II-30. Spectre RMN ¹ H (zone δ 3.6-7.6 ppm) du composé 13 (270 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	66
Figure II-31. Structure de la 5-méthylpinobanksine (13).....	66
Figure II-32. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-6 et spectres UV des composés 10, 26, 37 et 38 .	67
Figure II-33. Structure de l'acide benzoïque (10)	67
Figure II-34. Spectre RMN ¹ H (zones δ 2.6-3.2 et 5.4-7.6 ppm) du composé 26 (270 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	68
Figure II-35. Structure de la pinoembrine (26)	68
Figure II-36. Spectre RMN ¹ H (zones δ 1.7-1.8, 3.8-3.9 et 4.6-7.8 ppm) des composés 37 et 38 (500 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	69
Figure II-37. Spectre NOESY (corrélations 6-OMe et H ₅) des composés 37 et 38	69
Figure II-38. Structure des férulates de benzyle (37) et de prényle (38).....	69
Figure II-39. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-8 et spectres UV des composés 14, 29 et 44	70
Figure II-40. Structure de l'acide cinnamique (14).....	70
Figure II-41. Structure de la pinobanksine-3-acétate (29).....	71
Figure II-42. Spectre RMN ¹ H (zones δ 3.8-4.9 et 6.3-7.7 ppm) du composé 44 (270 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	71
Figure II-43. Spectre NOESY (corrélations 7-OMe et H ₈) du composé 44.....	72
Figure II-44. Structure de l'isoféruleate de cinnamyle (44)	72
Figure II-45. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-13 et spectres UV des composés 1, 2, 16 et 32 ...	72
Figure II-46. Structure du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (1) et de l'acide 4-hydroxybenzoïque (2)	73
Figure II-47. Structure de la naringénine (16).....	73
Figure II-48. Chromatogrammes HPLC de la fraction CF2-7 (280 et 254 nm) et spectres UV des composés 12, 35, 36 et 45.....	74
Figure II-49. Spectres RMN ¹ H (zones δ 3.2-3.8 et 7.8-8.2 ppm) (a) et ¹³ C (b) du composé 12.....	75
Figure II-50. Structure de l'acide 3-phénylpropanoïque (12).....	75
Figure II-51. Structure du <i>p</i> -coumarate de benzyle (35)	76

Figure II-52. Structure de la galangine (36).....	76
Figure II-53. Structure du <i>p</i> -coumarate de cinnamyle (45).....	76
Figure II-54. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-10 et spectres UV des composés 28 et 30.....	77
Figure II-55. Spectre RMN ¹ H (zones δ 1.6-2.5, 4.2-5.5 et 6.1-7.7 ppm) des composés 28 et 30 (270 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	78
Figure II-56. Structures des caféates d'isopent-3-ènyle (28) et de prényle (30)	78
Figure II-57. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-9 et spectres UV des composés 3, 5, 6, 17, 25, 39 et 40.....	79
Figure II-58. Spectre RMN ¹ H (zones δ 2.50-2.55, 3.90-3.95, 6.8-7.9 et 9.72-9.76 ppm) des composés 3, 5 et 6 (270 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	80
Figure II-59. Structures des 4-hydroxybenzaldéhyde (3), vanilline (5) et 4-hydroxyacétophénone (6).....	81
Figure II-60. Structure de la pinobanksine (17).....	81
Figure II-61. Spectre RMN ¹ H (zone δ 5.9-7.6 ppm) du composé 25 (270 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	82
Figure II-62. Structure de l'acide cinnamylidène acétique (25)	82
Figure II-63. Spectre RMN ¹ H (zones δ 3.6-4.2, 6.2-8.3 et 12.1-12.2 ppm) des composés 39 et 40 (270 MHz, acétone-d ₆ , δ _{TMS} 0 ppm)	83
Figure II-64. Structures de la rhamnocitrine (39) et du kaempféride (40)	83
Figure II-65. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-11 et spectres UV des composés 15, 18, 27, 33 et 42	84
Figure II-66. Structures de l'acide 4-méthoxycinnamique (15) et de la quercétine (18).....	85
Figure II-67. Structures des caféates de benzyle (27), de phényléthyle (CAPE) (33) et de cinnamyle (42) .	85
Figure II-68. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-5 et spectre UV du composé 48	86
Figure II-69. Structure de la tectochrysin (48)	86
Figure II-70. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-4 et profil UV du composé 46.....	87
Figure II-71. Structure de l'alpinone-3-acétate (46)	87
Figure II-72. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-1 et profils UV des composés 49-52	88
Figure II-73. Spectre RMN ¹ H (zone δ 5.2-7.9 ppm) du composé 49 (270 MHz, CDCl ₃ , δ _{TMS} 0 ppm)	89
Figure II-74. Structure du cinnamate de benzyle (49).....	89
Figure II-75. Structure du benzoate de cinnamyle (50)	89
Figure II-76. Structure du cinnamate de cinnamyle (51)	90
Figure II-77. Spectre RMN ¹ H (δ zone 4.8-7.6 ppm) du composé 52 (270 MHz, CDCl ₃ , δ _{TMS} 0 ppm)	90
Figure II-78. Structure du cinnamylidène acétate de cinnamyle (52)	90
Figure II-79. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-20 et profils UV des composés 20-22.....	91
Figure II-80. Structure de la 5-méthylpinocembrine (20)	91
Figure II-81. Structures des 1,3-dicoumaroylglycérol (21) et 1-féruoyl-3-coumaroylglycérol (22).....	92
Figure II-82. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-15 et profil UV du composé 24	92
Figure II-83. Structure de l'apigénine (24).....	93
Figure II-84. Chromatogramme HPLC de l'extrait DCM E09-2 et profils UV des composés 19 et 23.....	93

Figure II-85. Structures des 3-méthylquercétine (19) et kaempférol (23)	94
Figure II-86. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-13 et profil UV du composé 41	94
Figure II-87. Spectre RMN ¹ H (zones δ 2.7-3.2 et 5.0-7.6 ppm) du composé 41 (270 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	95
Figure II-88. Spectre RMN ¹ H (zones δ 5.00-5.16 et 6.58-6.82 ppm) du composé 41 (270 MHz, acétone-d ₆ , δ _{TMS} 0 ppm).....	96
Figure II-89. Corrélations COSY et HMBC du composé 41	97
Figure II-90. Structure de la 6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-èn-1-yl] pinocembrine (41)	97
Figure II-91. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-18 et profil UV du composé 43.....	98
Figure II-92. Spectre RMN ¹ H (zones δ 2.25-4.75 et 6.1-8.1 ppm) et agrandissement de la zone δ 6.80-7.40 du composé 43 (270 MHz, acétone-d ₆ , δ _{TMS} 0 ppm)	99
Figure II-93. Corrélations COSY, HMBC et NOESY du composé 43	100
Figure II-94. Structure des 8-[(E)-phénylprop-2-èn-1-one]-5-méthoxycatéchine (2R,3S) (43a) et (2S,3R) (43b).....	101
Figure II-95. Chromatogrammes HPLC à λ 254 nm (a) et 280 nm (b) de l'extrait DCM regroupant les 51 composés identifiés (méthode 1)	101
Figure II-96. Chromatogrammes HPLC à 280 nm des extrait DCM (E04-2) et aqueux (E05-1) (méthode optimisée : méthode 2) avec les douze marqueurs	104
Figure II-97. Acide gallique	111
Figure II-98. Droite d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux	111
Figure II-99. Quercétine (18)	112
Figure II-100. Droite d'étalonnage du dosage des flavones/flavonols.....	112
Figure II-101. Naringénine (16).....	113
Figure II-102. Droite d'étalonnage du dosage des flavanones/dihydroflavonols.....	114
Figure II-103. Chromatogramme HPLC et profil UV du composé 43 (méthode 2)	121

Chapitre III

Figure III-1. Structure du radical diphénylpicrylhydrazyle (DPPH')	127
Figure III-2. Structures du Trolox et de l'α-tocophérol (Vitamine E)	128
Figure III-3. Activité antioxydante des différents extraits de propolis par la méthode DPPH	128
Figure III-4. Structures de la fluorescéine et de l'AAPH	129
Figure III-5. Activité antioxydante des différents extraits de propolis par la méthode ORAC.....	130
Figure III-6. Corrélations PT-DPPH et PT-ORAC réalisées avec dix extraits de propolis française (E01-08 excepté E06-1 Aq)	131
Figure III-7. Extraits aqueux (E05-1 Aq, a) et organiques (E04-2 DCM, b)	132
Figure III-8. Valeurs DPPH pour quelques acides et esters phénoliques.....	133
Figure III-9. Réaction de piégeage de radicaux libres par la méthode de DPPH et délocalisation des électrons pour les acides ou esters caféiques (R= H ou groupement carboné)	134

Figure III-10. Valeurs DPPH pour quelques flavonoïdes	135
Figure III-11. Groupements et fonctions influençant l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	135
Figure III-12. Formation des AGEs.....	137
Figure III-13. Principe du test anti-AGEs	138
Figure III-14. Fractionnement bioguidé (activité anti-AGEs) de l'extrait DCM.....	140
Figure III-15. Chromatogrammes HPLC des huit fractions les plus actives (λ 280 nm, méthode 1)	141
Figure III-16. Corrélation DPPH-anti-AGEs réalisée avec dix extraits de propolis (E01-08 excepté E06-1 Aq) et l'extrait EtOH de <i>S. Japonicum</i>	143
Figure III-17. Corrélation DPPH-anti-AGEs réalisée avec 17 constituants de la propolis (composés 4, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 43).....	144
Figure III-18. Structures des flavonoïdes ayant servis de support aux études de chélation avec les métaux de transitions.....	145
Figure III-19. Piégeage du méthylglyoxal par l'épigallocatechine gallate	146
Figure III-20. Voies de formation des adduits mono et di-MGO-EGCG sous conditions neutres ou basiques.....	146
Figure III-21. Structure des dérivés de la pinobanksine	147
Figure III-22. Comparaison des activités anti-AGEs (CI_{50}) des différents composés purs analysés	148
Figure III-23. Plan de la microplaque du test antifongique (microdilution).....	165
Figure III-24. Schéma d'une boîte de Pétri servant à l'évaluation microbiologique d'extraits ou de composés.....	166

Chapitre IV

Figure IV-1. Zones de collecte des lots de propolis	174
Figure IV-2. Exemples de pollens : BAFLU Fagaceae (chataignier), BOU Rosaceae (aubépine, ronce), CRE Asteraceae (pissenlit, millefeuille, tournesol)	175
Figure IV-3. Rendements d'extraction (n=1) des 24 lots de propolis constituant M1 vs Moyenne des 24 lots (n=24) et M1 (n=1)	177
Figure IV-4. Diagramme de distribution (nombre de lots de propolis en fonction du rendement en EEP) ...	178
Figure IV-5. Taux de PT (en mg GAE/g), de FD (en mg NE/g) et de FF (en mg QE/g) des 24 lots de propolis constituant M1 (n=3) vs Moyenne des 24 lots (n=24) et M1 (n=3)	179
Figure IV-6. Diagrammes de distribution (nombres de lots de propolis en fonction de leurs taux de PT, FD et FF).....	180
Figure IV-7. Taux cumulé des 12 marqueurs des 24 lots de propolis constituant M1 (n=3) vs Moyenne des 24 lots (n=24) et M1 (n=3).....	181
Figure IV-8. Diagramme de distribution (nombre de lots de propolis en fonction du taux cumulé des 12 marqueurs)	181
Figure IV-9. Activité AO DPPH des 24 lots de propolis constituant M1 (n=3) vs Moyenne des 24 lots (n=24) et M1 (n=3)	182
Figure IV-10. Diagramme de distribution (nombre de lots de propolis en fonction de l'activité AO DPPH) ..	182

Figure IV-11. Activité anti-AGEs des 24 lots de propolis constituant M1 (n=1) vs Moyenne des 24 lots (n=24) et M1 (n=1)	183
Figure IV-12. Diagramme de distribution (nombre de lots de propolis en fonction de l'activité anti-AGEs) .	184
Figure IV-13. Provenance des lots de propolis les moins intéressants (départements colorés en jaune) – Délimitation de la zone Grand Ouest	187
Figure IV-14. Répartition des zones Grand-Ouest, Sud-Ouest et Sud-Est	189
Figure IV-15. Taux de PT, FD, FF, T12 et activité DPPH de la moyenne des 24 lots et des 3 régions G-O, S-O et S-E.....	191
Figure IV-16. Répartition des zones Grand-Ouest, Montagne et Plaine/Méditerranée.....	192
Figure IV-17. Taux de PT, FD, FF, T12 et activité DPPH de la moyenne des 24 lots et des 3 régions G-O, Mont et P-M.....	193
Figure IV-18. Répartition des zones Grand-Ouest et Sud	194
Figure IV-19. Taux de PT, FD, FF, T12 et activité DPPH de la moyenne des 24 lots et des 2 régions G-O et Sud	195
Figure IV-20. Chromatogramme HPLC de l'extrait aqueux du laboratoire (λ 280 nm, méthode 1).....	198
Figure IV-21. Quantification des sept marqueurs dans les 3 extraits aqueux (n=1)	199
Figure IV-22. Proportions relatives des sept marqueurs dans les 3 extraits aqueux (n=1)	200
Figure IV-23. Taux de polyphénols totaux et activité antioxydante des 3 extraits aqueux (n=3).....	200
Figure IV-24. Illustration du domaine de variation d'un facteur	203
Figure IV-25. Illustration du domaine d'étude	203
Figure IV-26. Illustration des sommets d'un domaine d'étude.....	204
Figure IV-27. Points aux sommets du domaine d'étude de notre exemple	207
Figure IV-28. Effets sur le rendement (plan EA)	215
Figure IV-29 : Interactions sur le rendement (plan EA)	216
Figure IV-30. Chromatogramme HPLC de l'extrait aqueux (essai 7) (λ 280 nm, méthode 2)	218
Figure IV-31 : Effets sur l'indice AO (plan EA)	220
Figure IV-32. Diagramme d'état de l'eau en fonction de la température et de la pression	221
Figure IV-33. Extrait aqueux subcritique (SUB01) et aqueux classique (EA1)	223
Figure IV-34. Profils HPLC des extraits SUB01 et EA1 (λ 280 nm, méthode 1).....	224
Figure IV-35. Profils HPLC de l'extrait SUB01 et des fractions SUB01-DCM, SUB01-AcOEt et SUB01- H ₂ O (λ 280 nm, méthode 1).....	225
Figure IV-36. Effets sur le rendement (plan EAS)	229
Figure IV-37. Comparaison des rendements EA vs EAS	233
Figure IV-38. Comparaison des taux de polyphénols totaux.....	234
Figure IV-39. Comparaison des indices AO.....	234
Figure IV-40. Profil HPLC de l'essai 7 de l'EAS et zoom au niveau des flavonoïdes quantifiés (λ 280 nm, méthode 2)	235
Figure IV-41. Extracteur Buchi E-914	239

Chapitre V

Figure V-1. Echantillons de propolis mexicaine, ivoirienne et ougandaise	247
Figure V-2. Comparaison des rendements d'extraction éthanolique (EEP) des 4 propolis	249
Figure V-3. Comparaison des rendements d'extractions successives des 4 propolis	250
Figure V-4. Comparaison des taux de polyphénols totaux des 4 propolis (EEP)	251
Figure V-5. Comparaison des profils CCM des 4 propolis (EEP)	251
Figure V-6. Comparaison des profils HPLC/DAD, présentés à la même échelle, des 4 propolis (EEP, 10 mg/mL, méthode 1, λ 280 nm)	252
Figure V-7. CCM de l'EEP mexicaine et des fractions A, B et C	253
Figure V-8. Chromatogramme GC (Courant ionique total TIC) de l'EEP mexicaine	254
Figure V-9. Structures des composés MEX-1 à 8 (issus des fractions A, B ou C)	255
Figure V-10. <i>Bursera simaruba</i> (Jardin botanique du CICY, Mérida, Mexique)	256
Figure V-11. <i>Lysiloma latisiliquum</i> (Jardin botanique du CICY, Mérida, Mexique)	256
Figure V-12. Chromatogrammes HPLC/DAD des propolis française et ivoirienne (EEP, 5 mg/mL, méthode 2, λ 280 nm)	257
Figure V-13. Carte de la végétation de Côte d'Ivoire	259
Figure V-14. CCM des EEP MEX et OUG et des extraits successifs de OUG	260
Figure V-15. Chromatogramme GC (TIC) de l'extrait OUG-DCM (zoom 15-23 min)	261
Figure V-16. Structures des composés OUG-1 à 6	262
Figure V-17. Chromatogramme HPLC de l'extrait OUG-DCM (méthode 3, λ 280 nm) et profils UV de ses composés majoritaires	263
Figure V-18. CCM comprenant les 2 fractions F et G (OUG-7 et 8)	264
Figure V-19. Chromatogramme HPLC de la fraction CF14-F (méthode 3, max plot) et profil UV du composé OUG-7	264
Figure V-20. Spectre RMN ^1H (zones δ 2.5-4.0 ppm et δ 6.2-8.0 ppm) du composé OUG-7 (500 MHz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0 ppm)	265
Figure V-21. Structure de la 6-méthoxycoelonine (OUG-7)	265
Figure V-22. Corrélations COSY, HMBC et NOESY du composé OUG-7	266
Figure V-23. Chromatogramme HPLC de la fraction CF14-G (méthode 3, max plot) et profil UV du composé OUG-8	267
Figure V-24. Spectre RMN ^1H (zones 2.7-2.9, 3.7-3.8 et 6.2-7.1 ppm) du composé OUG-8 (500 MHz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0 ppm)	267
Figure V-25. Structure du 3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle (OUG-8)	268
Figure V-26. Corrélations COSY et HMBC du composé OUG-8	269
Figure V-27. Chromatogramme HPLC de l'extrait OUG-MeOH (méthode 1, λ 280 nm), profils UV et données MS de ses composés majoritaires	269
Figure V-28. Chromatogramme HPLC de la fraction CF15-A (méthode 4, max plot) et profil UV du composé OUG-9	270

Figure V-29. Spectre RMN ¹ H (zones δ 1.9-4.1 et δ 5.3-7.6 ppm) du composé OUG-9 (500 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	271
Figure V-30. Structure de l'acide chlorogénique (OUG-9)	271
Figure V-31. Corrélations COSY, HMBC et NOESY du composé OUG-9	272
Figure V-32. Chromatogramme HPLC de la fraction CF15-C (méthode 4, max plot) et profils UV des composés OUG-10 et OUG-11	273
Figure V-33. Spectre RMN ¹ H (zones δ 2.3-5.0 et δ 6.0-6.5 ppm) du composé OUG-10 majoritaire en violet (et OUG-11 minoritaire en gris) (500 MHz, CD ₃ OD, δ _{TMS} 0 ppm)	273
Figure V-34. Structure de la biflorine (OUG-10).....	274
Figure V-35. Corrélations COSY et HMBC du composé OUG-10	275
Figure V-36. Structure de l'isobiflorine (OUG-11)	276
Figure V-37. Chromatogramme HPLC à λ 280 nm de l'EEP ougandaise regroupant les cinq composés identifiés après purification (méthode 1)	276
Figure V-38. Carte de l'Ouganda.....	277

Les photographies, mentionnées dans les figures ci-dessus, dont la source n'est pas indiquée ont été prises par mes soins au laboratoire.

Table des tableaux

Chapitre I

Tableau I-1. Exemples de types de propolis avec leur origine botanique et leur composition chimique	23
---	----

Chapitre II

Tableau II-1. Rendement d'extraction par EtOH 70% et MeOH selon deux modes d'agitation : agitation magnétique (AM) (5% de propolis, 3x24h) ou ultrasons (US) (5% de propolis, 3x2h)	47
Tableau II-2. Rendements (en %) de chaque extraction par l'EtOH 70% (3x2h)	48
Tableau II-3. Comparaison des taux de FF et FD (ainsi que ceux des PT) de l'extrait moyen alcoolique BFA avec la littérature	57
Tableau II-4. Données RMN ¹ H et ¹³ C (dans CD ₃ OD) du composé 41	97
Tableau II-5. Données RMN ¹ H et ¹³ C (dans l'acétone-d ₆) du composé 43	100
Tableau II-6. Composition chimique la propolis française de Ballot-Flurin	102
Tableau II-7. Quantification des douze marqueurs dans six extraits de propolis	105
Tableau II-8. Teneur (en mg/g) des 52 composés identifiés dans la propolis française étudiée	106
Tableau II-9. Masses et pourcentages de chaque fraction issue de l'extrait DCM E09-2 (21 g)	116
Tableau II-10. Equations et coefficients de corrélation des droites d'étalonnage des 12 marqueurs	120

Chapitre III

Tableau III-1. Activité anti-AGEs des différents extraits de propolis	139
Tableau III-2. Activité anti-AGEs des composés purs	142
Tableau III-3. Activité antifongique (CMI ₈₀) de six extraits de propolis sur <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> et <i>A. fumigatus</i>	152
Tableau III-4. Activité antibactérienne de six extraits de propolis (100 µg/mL) sur 28 souches Gram(-) et Gram(+)	156
Tableau III-5. Activité antibactérienne (CMI ₁₀₀) des cinq extraits organiques de propolis sur 14 souches Gram(+)	157
Tableau III-6. Comparaison des taux de polyphénols totaux et de flavonoïdes totaux avec les CMI ₈₀ contre <i>C. albicans</i> et <i>glabrata</i> et la CMI ₁₀₀ contre <i>S. aureus</i>	158
Tableau III-7. Activités antifongiques et antibactériennes des cinq composés majoritaires des extraits organiques de propolis BFA	159
Tableau III-8. Activités antifongiques et antibactériennes du composé nouveau 43	160

Chapitre IV

Tableau IV-1. Lieux et dates de collecte des 24 lots de propolis française	173
Tableau IV-2. Sources de plantes possibles pour les résidus et pelotes de pollens	175
Tableau IV-3. Données statistiques des différents paramètres étudiés pour les 24 lots : rendement en EEP (Rdt), taux de PT, FD, FF et T12 ainsi qu'activités DPPH et anti-AGEs.....	184
Tableau IV-4. Analyse de variance (ANOVA, Test de Holm-Sidak, $P < 0.05$) des taux de PT, FD, FF, T12 et activité DPPH pour les 24 lots.....	186
Tableau IV-5. Tableau des différences significatives des propolis de la zone Grand Ouest (ANOVA, $P < 0.05$)	188
Tableau IV-6. Analyse de variance des 5 paramètres pour la zone Sud-Ouest (ANOVA, $P < 0.05$)	190
Tableau IV-7. Analyse de variance des 5 paramètres pour la zone Sud-Est (ANOVA, $P < 0.05$)	190
Tableau IV-8. Analyse de variance des 5 paramètres pour la zone Sud Montagne (ANOVA, $P < 0.05$).....	192
Tableau IV-9. Analyse de variances des 5 paramètres pour la zone Plaine/Méditerranée (ANOVA, $P < 0.05$)	193
Tableau IV-10. Comparaison des conditions opératoires des trois procédés d'extraction aqueuse	197
Tableau IV-11. Comparaison de l'aspect des filtrats et des rendements d'extraction des trois procédés d'extraction aqueuse	198
Tableau IV-12. Quantification des sept marqueurs dans les 3 extraits aqueux ($n = 1$).....	199
Tableau IV-13. Matrice à 2 facteurs illustrant l'exemple utilisé	206
Tableau IV-14. Exemple de la matrice d'Hadamard dans le cadre d'un plan factoriel complet à 3 facteurs.	206
Tableau IV-15. Matrice, facteurs et réponses de notre exemple	208
Tableau IV-16. Matrice de calcul des effets	209
Tableau IV-17. Facteurs du plan d'expériences de l'extraction aqueuse	211
Tableau IV-18. Matrice du plan d'expériences de l'extraction aqueuse	211
Tableau IV-19. Résultats du plan d'expériences de l'extraction aqueuse	212
Tableau IV-20. Matrice de calcul des effets du rendement (plan EA).....	213
Tableau IV-21. Calcul de l'intervalle de confiance du rendement (plan EA)	214
Tableau IV-22. Effets et interactions sur le rendement (plan EA)	214
Tableau IV-23. Analyse des résultats des taux des polyphénols totaux (plan EA)	217
Tableau IV-24. Quantité des cinq polyphénols (plan EA).....	218
Tableau IV-25. Analyse des résultats de l'indice AO (plan EA).....	219
Tableau IV-26. Conditions d'extraction par l'eau subcritique de différentes plantes.....	222
Tableau IV-27. Taux de PT, FD et FF pour SUB01 et EA1	226
Tableau IV-28. Facteurs du plan d'expériences de l'extraction par l'eau subcritique	227
Tableau IV-29. Résultats (plan EAS)	227
Tableau IV-30. Matrice de calcul des effets du rendement (plan EAS).....	228
Tableau IV-31. Analyse des résultats du rendement (plan EAS)	229
Tableau IV-32. Analyse des résultats du taux de polyphénols totaux (plan EAS).....	230
Tableau IV-33. Quantité des cinq polyphénols (plan EAS).....	231

Tableau IV-34. Analyse des résultats de l'indice AO (plan EAS)	231
Tableau IV-35. Taux de flavonoïdes (plan EAS)	236
Tableau IV-36. Quantités de flavonoïdes (plan EA)	236
Tableau IV-37. Cycles d'extraction par l'eau subcritique de l'essai préliminaire	239
Tableau IV-38. Cycles d'extraction par l'eau subcritique des essais du plan EAS	240
Tableau IV-39. Equations et coefficients de corrélation des droites d'étalonnage des 7 marqueurs	240

Chapitre V

Tableau V-1. Rendements des fractions A, B and C et valeurs de R _f des composés majoritaires (CCM)	253
Tableau V-2. Quantification des 12 marqueurs pour les EEP des propolis française et ivoirienne.....	258
Tableau V-3. Données RMN ¹ H et ¹³ C (dans CDCl ₃) du composé OUG-7	266
Tableau V-4. Données RMN ¹ H et ¹³ C (dans CDCl ₃) du composé OUG-8	268
Tableau V-5. Données RMN ¹ H et ¹³ C (dans CD ₃ OD) du composé OUG-9.....	272
Tableau V-6. Données RMN ¹ H et ¹³ C (dans CD ₃ OD) du composé OUG-10	274
Tableau V-7. Données RMN ¹ H (dans DMSO- <i>d</i> 6) des composés OUG-10 et 11	275
Tableau V-8. Activités antioxydante et anti-AGEs des quatre propolis (EEP)	278
Tableau V-9. Activités antifongique et antibactérienne des quatre propolis (EEP)	279

Table des annexes

Annexe 1 : Taux de PT, FF et FD des extraits de propolis E01-08	317
Annexe 2 : Etude structurale préliminaire de six polyphénols commerciaux	318
Annexe 3 : Récapitulatif des composés identifiés dans la propolis BFA (méthode 1)	325
Annexe 4 : Spectres RMN de la 6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-en-1-yl]pinocembrine (41) ..	351
Annexe 5 : Spectres RMN de la 8-[(E)-phénylprop-2-en-1-one]-5-méthoxycatéchine (43)	355
Annexe 6 : Chromatogrammes HPLC des fractions CF2-1 à 26	359
Annexe 7 : Activités DPPH et anti-AGEs des extraits de propolis E01-08 et de 17 de ses constituants	361
Annexe 8 : Spectres RMN (Propolis mexicaine, MEX)	362
Annexe 9 : Analyse GC/MS (Propolis mexicaine, MEX)	365
Annexe 10 : Analyse GC/MS (Propolis ougandaise, OUG)	368
Annexe 11 : Spectres RMN de la 6-méthoxycoelonine (OUG-7)	372
Annexe 12 : Spectres RMN du 3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle (OUG-8)	375
Annexe 13 : Spectres RMN de l'acide chlorogénique (OUG-9)	378
Annexe 14 : Spectres RMN des biflorine et isobiflorine (OUG-10 et 11)	381
Annexe 15 : Récapitulatif des composés identifiés dans la propolis ougandaise (OUG-7 à 11) ...	385

Abbréviations et acronymes

2D : 2 dimensions	CMI₈₀ : Concentration minimale inhibitrice à 80%
AAPH : 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dichlorhydrate	CO₂ : Dioxyde de carbone
AB : Agriculture biologique	COSY : correlated spectroscopy
ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)	COX : Cyclo-oxygénase
AcOEt : Acétate d'éthyle	CZE ou ECZ : Electrophorèse capillaire de zone
AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments	d : doublet
AGEs : Advanced Glycation End-products (produits terminaux de glycation)	DAD : Diode array detector
AlCl₃ : Chlorure d'aluminium	DCM : Dichlorométhane
AM : Agitation magnétique	dd : doublet dédoublé
ANOVA : Analyse de variance	DL₅₀ : Dose létale médiane
AO : antioxydant(e)	DMSO : Diméthylsulfoxyde
APCI : Atmospheric pressure chemical ionisation	DNP : 2,4-dinitrophénylhydrazine
Aq : Aqueux	DO : Densité optique
ARDB : Antibiotic Resistance Genes Database	DPPH : Diphénylpicrylhydrazyle
ATCC : American type culture collection	dt : Doublet détriplé
AYE : Code patient	E392 : Extrait éthanolique de romarin
AZT : Azidothymidine	EA : Extraction aqueuse
Benth. : George Bentham	EAS : Extraction par l'eau subcritique
BFA : Ballot-Flurin Apiculteurs	EC₅₀ : half maximal Extinction Coefficient
BHT : Butylhydroxytoluène	EEP : Extrait éthanolique de propolis
br : broad (élargi)	EGCG : épigallocatechine gallate
BSA : Albumine de sérum bovin	em : émission
CAPE : Caffeic acid phenethyl ester	ERO : Espèces réactives de l'oxygène
CC : Chromatographie sur colonne	ESI : Electrospray ionisation
CCM : Chromatographie sur couche mince	EtOH : Ethanol
CD : cluster de différenciation (lymphocytes CD4 et 8)	EU : European Union
(CD₃)₂CO : Acétone deutéré	exc : excitation
CD₃OD : Méthanol deutéré	FD : Flavanone/dihydroflavonol
CDCl₃ : Chloroforme deutéré	FF : Flavone/flavonol
CF : Chromatographie Flash	FL : Fluorescéine
CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%	FRA : propolis française de Ballot-Flurin
CICY : Centro de Investigación Científica de Yucatán	FRAP : Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
CI P : Collection de l'Institut Pasteur	g/ mol : gramme par mole
CI V : Propolis ivoirienne	GAE : Equivalent d'acide gallique
CMI : Concentration minimale inhibitrice	GC ou CG : Chromatographie gazeuse
CMI₁₀₀ : Concentration minimale inhibitrice à 100%	GC/ MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
	G-O : Grand Ouest
	H₂O : Molécule d'eau
	HAT : Transfert d'atome d'hydrogène
	HMBC : Heteronuclear multiple-bond correlation

HMQC : Heteronuclear multiple-quantum correlation
HPLC ou CLHP : Chromatographie liquide haute performance
HPLC/ DAD : High-performance liquid chromatography coupled with diode-array detection
HPLC/ MS ou LC/ MS : High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry
HRESI MS : High-resolution electrospray mass spectrometry
Hz : Hertz
IL : Interleukine
INRA : Institut national de la recherche agronomique
J : Constante de couplage
L : Litre
L. : Karl Von Linné
LLC : Lewis Lung carcinoma
M : Masse molaire
m : Multiplet
m/ z : Masse sur charge
MEKC : Micellar electrokinetic chromatography
MeOD : Méthanol deutéré
MeOH : Méthanol
MEX : Propolis mexicaine
MF : Mac Ferlan
mg : Milligramme
MGO : Méthylglyoxal
MHz : Méga Hertz
min : Minute
mL : Millilitre
mM : Millimolaire
Mont : Montagne
MOPS : Acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique
Moy : Moyenne
MS- ou -MS : Spectrométrie de masse en mode négatif
MS ou SM : Spectrométrie de masse
MS+ ou + MS : Spectrométrie de masse en mode positif
MT : Métaux de transition
Na₂CO₃ : Carbonate de sodium
NADPH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAOEL : No observable adverse effect level
NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards
NE : Equivalent de naringénine
NIIST : National Institute of Standards and Technology
nm : Nanomètre
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity
OUG : Propolis ougandaise
P10/ P90 : Percentile à 10/90%
Pmed : Plaine Méditerranée
ppm : Partie par million
psi : Pound-force per square inch
PT : Polyphénols totaux
QE : Equivalent de quercétine
R² : Coefficient de détermination
RAGE : Récepteur aux AGEs
RCC : Renal cell carcinoma
RCH : Code patient
Rdt : Rendement
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance magnétique nucléaire
rpm : Rotation par minute
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
s : singulet
SAN : Code patient
Sarg. : Charles Sprague Sargent
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
sd : standard deviation (écart-type)
S-E : Sud-Est
SET : Transfert d'électron singulet
S-O : Sud-Ouest
SONAS : Substances d'origine naturelle et analogues structuraux
t : triplet
T12 : taux cumulé des 12 marqueurs
td : Triplet dédoublé
TE : Equivalent Trolox
TIC : Courant ionique total
TMS : Tétraméthylsilane
TNF- α : Tumor necrosis factor α
t_R : Temps de rétention
TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
UE : Union Européenne
uma : Unité de masse atomique
US : Ultrasons
UV : Ultraviolet
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
YPDA : Yeast Peptone Dextrose Agar

ZDV : Zidovudine

δ : déplacement chimique

ϵ : Constante diélectrique

λ : longueur d'onde

μg : Microgramme

μL : Microlitre

μM : Micromolaire

Introduction

Introduction

La propolis est l'un des six produits de la ruche avec le miel, la gelée royale, le pollen, la cire et le venin d'abeille. La propolis est un complexe fabriqué par les abeilles (*Apis mellifera*) à partir de leurs sécrétions salivaires, de cire et d'une série de substances résineuses qu'elles vont recueillir sur différents supports végétaux comme les bourgeons, jeunes rameaux, ou encore blessures de certains arbres et arbustes (en Europe : principalement peupliers, bouleaux, saules, hêtres, etc.). Dans la ruche, la propolis a de multiples usages : c'est un mortier qui sert au colmatage des fissures ou interstices, à l'étanchéité (face à l'humidité et au développement des moisissures) et à la protection de la colonie par la réduction de l'entrée de la ruche. En effet, l'ouverture à l'entrée de la ruche est constamment remodelée afin d'ajuster ses dimensions et son orientation aux conditions climatiques. Ce passage constitue par la même occasion une sorte de "sas de décontamination" où chaque abeille rentrante et sortante devra se poser, d'où le nom de propolis qui vient du grec ancien *pro* pour "devant, à l'entrée de" et *polis* pour "communauté, cité"¹. La propolis est aussi une véritable arme chimique contre les microorganismes et sert à momifier les animaux intrus et morts (rats et souris par exemple) trop gros pour être évacués par les abeilles, évitant ainsi leur décomposition². La propolis est généralement constituée d'environ 50 % de résines (contenant les composés polyphénoliques), 30 % de cires et d'acides gras, 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % de matières organiques et minérales diverses. Mais la composition de la propolis est très variable car elle dépend de la végétation locale³. Ainsi, la propolis collectée dans les zones tempérées telles que l'Europe, le nord de l'Amérique ou les régions non-tropicales de l'Asie, provient principalement des bourgeons d'espèces de peuplier et est riche en flavonoïdes, acides et esters phénoliques² alors que la propolis d'origine tropicale, c'est-à-dire issue de régions où les peupliers et les bouleaux ne poussent pas, est plutôt riche en dérivés prénylés d'acides phénoliques, benzophénones ou composés di et triterpéniques^{4,5}, provenant de diverses espèces botaniques. Bien que sa composition soit variable, la propolis est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle, car elle présente de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques telles que des activités antioxydante⁶⁻⁸, antifongique⁹⁻¹⁰, antibactérienne¹¹⁻¹², antivirale¹³, anti-inflammatoire¹⁴ ou encore antitumorale¹⁵.

La propolis est une matière première très étudiée et très utilisée de nos jours dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques, et ce de par le monde. En effet, une première étude

bibliographique, réalisée à l'initiation de ce travail de recherche (2011), montrait que la propolis utilisée dans de nombreux procédés et produits finis brevetés provenant de différents pays asiatiques dont le Japon (32%), la Corée du Sud (21%) et la Chine (10%) mais également en Russie (18%). Elle est en effet intégrée dans des produits alimentaires tels que compléments (Japon, Corée, Russie), boissons (vin, champagne, bière en Corée), miel (Corée) ou encore conservateurs (préservation des mangues en Chine), dans des formulations cosmétiques tels que shampoings, crèmes de visage (Japon, Corée, Russie) et crèmes solaires (Etats-Unis, Allemagne), mais surtout dans des préparations pharmaceutiques comme des gels contre l'herpès (Roumanie, Etats-Unis), des pommades cicatrisantes (Russie), des bains de bouche (Corée) et préparations médicinales contre les abcès dentaires (Chine), des pâtes dentifrices (Japon), des médicaments à visée anti-cancéreuse (Japon), anti-ulcère (Russie), des gouttes et sprays pour la sphère oto-rhino-laryngée (Allemagne), etc. Elle entre même, par exemple, dans des produits divers tels que la composition d'une colle (Chine) ou encore d'une lingette de nettoyage (Corée).

La société Ballot-Flurin Apiculteurs (BFA), aujourd'hui devenue Abeilles Santé, est une entreprise comptant une quarantaine d'employés et située dans les Hautes-Pyrénées (65), qui développe des produits d'hygiène, cosmétiques et alimentaires à partir de produits de la ruche issus de la filière d'Apiculture DOUCE® et notamment à base de propolis. Ces produits bénéficient de différents labels publics ou privés : Agriculture Biologique (marque AB), EU organic, COSMEBIO® et COSMEBIO ECO®. BFA dispose de ses propres ruches mais également d'un réseau d'apiculteurs qui fournissent une propolis de qualité optimale, répondant à un cahier des charges bien précis. Afin de poursuivre son développement au niveau national et international, l'entreprise a souhaité approfondir ses connaissances scientifiques, notamment en termes de composition chimique et d'activités biologiques, sur ses extraits de propolis obtenus selon son mode d'extraction particulier et breveté¹⁶. Ainsi, une collaboration s'est établie avec le laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS) de l'Université d'Angers au travers du financement de cette thèse dont l'objectif était de caractériser chimiquement cette propolis et d'en évaluer les propriétés biologiques tout en optimisant, le cas échéant, les procédés d'extraction.

Ce manuscrit se divise en cinq chapitres. Le premier se propose de faire un point bibliographique sur les méthodes d'extraction et de caractérisation, sur la diversité chimique des propolis à travers le monde et sur les différentes activités biologiques attribuées à ce matériau. Le deuxième chapitre sera consacré à la détermination de la composition chimique de plusieurs extraits

obtenus à partir de la propolis BFA (assemblage de 24 lots). Dans le troisième chapitre, quatre activités biologiques (antioxydante, anti-AGEs, antifongique et antibactérienne) seront évaluées pour les différents extraits de propolis réalisés et des relations composition-activité seront proposées. Le quatrième chapitre, confidentiel selon les exigences de l'entreprise BFA, sera divisé en deux parties, la première concernera l'étude de variabilité des 24 lots composant le mélange initial, ceci permettant d'estimer les écarts de composition entre les différents lots ; la deuxième partie sera centrée sur l'optimisation des procédés de l'extraction aqueuse réalisée par BFA. Le cinquième et dernier chapitre présentera brièvement l'étude de trois "propolis du monde" : une propolis mexicaine, provenant du Yucatán, et deux propolis africaines, l'une provenant de Côte d'Ivoire et l'autre d'Ouganda.

Bibliographie de l'introduction (1-16)

- (1) Cardinault, N.; Cayeux, M.-O.; Sert, P. P. du. La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie* **2012**, *10*, 298–304.
- (2) Bankova, V.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie* **2000**, *31*, 3–15.
- (3) Marcucci, M. C. Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie* **1995**, *26*, 83–99.
- (4) Bankova, V.; Popova, M.; Trusheva, B. Plant Sources of Propolis: An Update from a Chemist's Point of View. *Natural Product Communications* **2006**, *1*, 1023–1028.
- (5) Salatino, A.; Fernandes-Silva, C. C.; Righi, A. A.; Salatino, M. L. F. Propolis Research and the Chemistry of Plant Products. *Natural Product Reports* **2011**, *28*, 925–936.
- (6) Cottica, S. M.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Franco, S. L.; Zeoula, L. M.; Visentainer, J. V. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2011**, *22*, 929–935.
- (7) Miguel, M. G.; Nunes, S.; Dandlen, S. A.; Cavaco, A. M.; Antunes, M. D. Phenols and Antioxidant Activity of Hydro-Alcoholic Extracts of Propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 3418–3423.
- (8) Gülçin, İ.; Bursal, E.; Şehitoğlu, M. H.; Bilsel, M.; Gören, A. C. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Lyophilized Aqueous Extract of Propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 2227–2238.
- (9) Ota, C.; Unterkircher, C.; Fantinato, V.; Shimizu, M. T. Antifungal Activity of Propolis on Different Species of *Candida*. *Mycoses* **2001**, *44*, 375–378.
- (10) Sawaya, A. C. H. F.; Palma, A. M.; Caetano, F. M.; Marcucci, M. C.; Da Silva Cunha, I. B.; Araujo, C. E. P.; Shimizu, M. T. Comparative Study of in Vitro Methods Used to Analyse the Activity of Propolis Extracts with Different Compositions against Species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology* **2002**, *35*, 203–207.
- (11) Raghukumar, R.; Vali, L.; Watson, D.; Fearnley, J.; Seidel, V. Antimethicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Activity of "Pacific Propolis" and Isolated Prenylflavanones. *Phytotherapy Research* **2010**, *24*, 1181–1187.
- (12) Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin. *Journal of Ethnopharmacology* **1999**, *64*, 235–240.
- (13) Nolkemper, S.; Reichling, J.; Sensch, K. H.; Schnitzler, P. Mechanism of Herpes Simplex Virus Type 2 Suppression by Propolis Extracts. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 132–138.
- (14) Ramos, A. F. N.; Miranda, J. L. Propolis: A Review of Its Anti-Inflammatory and Healing Actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **2007**, *13*, 697–710.
- (15) Carvalho, A. A.; Finger, D.; Machado, C. S.; Schmidt, E. M.; Costa, P. M. da; Alves, A. P. N. N.; Morais, T. M. F.; Queiroz, M. G. R. de; Quináia, S. P.; Rosa, M. R. da; Santos, J. M. T. dos; Pessoa, C.; Moraes, M. O. de; Costa-Lotufo, L. V.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Torres, Y. R. In Vivo Antitumoural Activity and Composition of an Oil Extract of Brazilian Propolis. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1239–1245.
- (16) Ballot-flurin, C. METHOD TO TREAT PROPOLIS. 20100135920, March 6, 2010.

Chapitre I :

Etude bibliographique

Chapitre I : Etude bibliographique

1. Un peu d'histoire

La propolis est un remède naturel qui est utilisé depuis les temps anciens. En effet, les Egyptiens connaissaient très bien les propriétés anti-putréfiantes de la propolis et l'utilisaient pour embaumer les cadavres. Les propriétés médicinales de la propolis étaient reconnues par les médecins grecs et romains : Aristote, Dioscoride, Pline l'Ancien et Galien, tout comme les médecins arabes, qui l'utilisaient comme antiseptique et cicatrisant dans le traitement des plaies, et par les Incas qui l'employaient en tant qu'agent anti-pyrétique^{17,18}. Au XII^{ème} siècle, la propolis est mentionnée dans des ouvrages de médecine en Géorgie où elle entre dans la composition de nombreux remèdes. En France, c'est Ambroise Paré qui en fait mention pour la première fois dans ses écrits au XVI^{ème} siècle¹⁸ et la propolis est listée comme médicament officiel dans la pharmacopée londonienne au XVII^{ème} siècle¹⁷. Sans avoir été permanent, l'emploi médical de la propolis s'est tout de même maintenu au fil des siècles pour être à nouveau redécouvert dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle, époque où l'intérêt porté aux propriétés médicinales de la propolis s'est accru, principalement en Europe. Le professeur Rémy Chauvin, alors directeur de recherches à l'INRA, au laboratoire de recherches apicoles de Bures-sur-Yvette en France, a publié avec ses collaborateurs le *Traité de biologie de l'abeille* en 1968, dans lequel la propolis tient une place importante, ce traité fait toujours référence en la matière¹⁹. A peu près à la même période le Danois K. Lund Aagaard devenu, à la retraite, apiculteur, testa sur lui-même une infusion de propolis qui lui soigna en quelques heures de terribles maux de gorges. Il poursuivi ses recherches, mena par la suite des essais cliniques sur 16000 scandinaves puis créa un produit breveté, très riche en flavonoïdes : la Propoline[®], aujourd'hui commercialisé dans le monde entier^{18,20}. Depuis une quarantaine d'années, le développement constant des techniques d'extraction et de caractérisation ont permis d'aller toujours plus loin dans l'identification de nouveaux constituants, fussent-ils minoritaires (plus de 300 molécules différentes sont aujourd'hui identifiées³), et dans l'investigation des activités biologiques.

2. Procédés d'extraction

La composition moyenne de la propolis est généralement de l'ordre de 50 % de résines (contenant les composés phénoliques), 30 % de cires et d'acides gras, 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % de matières organiques et minérales diverses¹⁸. Ainsi, afin d'obtenir un concentré de métabolites secondaires actifs et de s'affranchir d'une matrice inerte, il est préférable d'extraire la propolis à l'aide de solvants. Différentes conditions (solvants divers, proportion en propolis, durée d'extraction, traitement) sont donc utilisées pour l'extraction de la propolis.

2.1. Solvants d'extraction

Les macérations alcooliques sont de loin les méthodes d'extractions les plus courantes. On retrouve par exemple comme solvants, l'éthanol en solution aqueuse à différents pourcentages : 20²¹, 30¹⁰, 50^{10,22}, 60^{6,21}, 70^{7,23-25}, 80²⁶⁻²⁸, 95-96^{6,29,30} et 99-100 % (absolu)^{10,22}, mais aussi le méthanol³¹⁻³³. Par exemple, Park et Ikegaki³⁴ ont utilisé plusieurs concentrations en éthanol dans des solutions hydro-alcooliques puis mesuré les spectres d'absorption des différents extraits. L'extrait à l'éthanol 80% présentait la plus forte absorption à 290 nm, c'est-à-dire la plus grande concentration en flavonoïdes. Certaines publications décrivent également des extractions aqueuses^{7,8,27}, des extractions successives avec des solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol et eau)²² ou encore des extractions par de l'huile de colza¹⁵. L'extraction à l'aide du CO₂ supercritique est également une technique intéressante puisque le CO₂ est entièrement éliminé après extraction ce qui permet d'obtenir un extrait sec sans résidu de solvant. Mais le rendement d'extraction est faible (inférieur à 13%) et il semble indispensable d'ajouter de l'éthanol comme co-solvant si on désire augmenter le rendement extractif des composés relativement polaires^{22,35}. D'une façon assez générale, ce sont les extractions par l'éthanol à 70 et 96% ainsi que par le méthanol qui demeurent majoritairement les plus répandues.

2.2. Proportion en propolis

La proportion en propolis est le rapport de la quantité de propolis engagée (en g) sur le volume de solvant utilisé (en mL) exprimé en %. Elle est comprise entre 0.1, valeur très faible³⁶ et 30%^{6,10,26}. Les valeurs les plus fréquemment rencontrées sont 3 à 3.3^{24,37,38}, 5^{6,21,39} et 10%⁴⁰⁻⁴². Sawaya⁴³ a réalisé des extractions en faisant varier la proportion en propolis de 5 à 30% et le pourcentage d'éthanol de 60 à 96%. Il ressort de cette étude que les plus fortes concentrations en composés phénoliques étaient obtenues pour les proportions en propolis les plus fortes et les pourcentages d'éthanol les plus faibles ; mais que la plus forte concentration en flavonoïdes était obtenue par le pourcentage d'éthanol le plus élevé.

2.3. Durée et température d'extraction

Les durées et les températures d'extraction sont assez variables. Pour les extraits alcooliques et hydroalcooliques, cela peut aller de 15 min à l'aide d'un extracteur⁶ jusqu'à 7-10 jours pour de longues macérations^{10,22,27} à température ambiante. Mais les durées d'extraction sont souvent de l'ordre de l'heure : de 1 heure²⁸, 3 fois 1 heure^{11,33} à 3 fois 1 heure et demi³¹, puis de 3 fois 5 heures³⁹ ou 6 heures³⁶, le plus souvent à température ambiante mais aussi jusqu'à 60°C lors, par exemple, des extractions successives avec les solvants de polarité croissante²². Ces extractions peuvent aussi durer plus longtemps, c'est-à-dire de l'ordre de la journée : de 24 heures le plus

souvent à température ambiante^{26,37,40} à 2 ou 3 fois 24 heures^{32,44,45} en passant par 3-4 jours en continu^{30,42}. En ce qui concerne les extractions aqueuses, cela dure en général 3 heures à 80⁷ ou 100°C^{26,46}.

2.4. Traitement

Le traitement le plus fréquemment employé est la filtration sur papier suivie par une évaporation à sec (à l'évaporateur rotatif sous pression réduite)^{7,11,30} mais ces deux opérations sont parfois précédées d'un refroidissement (à -18°C au congélateur) afin d'éliminer les cires^{22,33,42}. Parfois, la centrifugation remplace ou précède la filtration^{24,28,41} et dans les cas des extractions aqueuses, les échantillons sont souvent lyophilisés^{8,26,46}.

2.5. Conservation

Avant extraction, la propolis est généralement conservée au congélateur (-18°C) avant d'être pulvérisée^{23,29,38} ou simplement conservée à température ambiante à l'obscurité²⁸. Après extraction, les échantillons sont conservés secs, soit à température ambiante et à l'abri de la lumière²⁷, soit au réfrigérateur (4°C)^{24,26,28} ou soit encore au congélateur (-20°C)¹¹. Les extraits sont parfois conservés à l'état liquide, après traitement, en attendant d'être analysés²⁵.

3. Techniques d'analyse et de caractérisation

3.1. Dosages spectrophotométriques

L'augmentation de l'utilisation des préparations à base de propolis dans le domaine médical, notamment, nécessite le développement de techniques d'analyses permettant la détermination quantitative des constituants actifs. Ainsi, les dosages spectrophotométriques, simples et rapides à mettre en œuvre, sont spécialement adaptés pour le contrôle de routine de la propolis. Ils concernent les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux⁴⁷ ou encore les deux classes de flavonoïdes suivantes : les flavones/flavonols et les flavanones/dihydroflavonols⁴⁸. En effet, Popova *et al.*²⁵ ont démontré que la quantification globale des familles de composés ayant des structures chimiques proches corrélait mieux avec les activités biologiques observées. Elle fournit ainsi plus d'informations que la quantification individuelle de composés. Ces méthodes sont, de plus, simples à mettre en place, offrent une bonne répétabilité et présentent une précision acceptable.

3.1.1. Dosages des polyphénols totaux

La méthode la plus couramment utilisée pour la détermination du taux de polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu^{49,50}. Très brièvement, la solution à tester, de l'eau distillée, du réactif de Folin-Ciocalteu et une solution aqueuse de carbonate de sodium sont mélangés. Après un temps d'incubation, l'absorbance est mesurée à 760 nm^{24,25}. La droite d'étalonnage est généralement

réalisée avec un standard comme l'acide gallique^{8,23,27} mais peut également l'être avec le phénol⁴³, l'acide caféique³³, la pinocembrine⁷ ou encore le mélange pinocembrine/galangine dans les proportions 2:1^{25,45}. Des taux de polyphénols totaux compris entre 200 et 300 milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme (mg GAE/g) ont été décrits pour des extraits éthanoliques de propolis de type peuplier⁵¹. Pour ceux de la propolis verte du Brésil, les taux de polyphénols sont plutôt compris entre 6.4 et 15.2% (m/m)⁴³. Malgré la sensibilité et la simplicité de la méthode, elle n'est cependant pas strictement spécifique des polyphénols. En effet, le réactif de Folin-Ciocalteu évalue la capacité réductrice totale de l'échantillon, et pas seulement celle des polyphénols. Il peut réagir également avec des protéines et composés aminés, des sucres réducteurs ou encore l'acide ascorbique⁵²⁻⁵⁴. Il est donc important de savoir globalement quelles sont les classes de molécules présentes dans l'échantillon à analyser pour une bonne estimation des polyphénols totaux par cette méthode.

3.1.2. Dosage des flavonoïdes

Alors que la méthode de Folin-Ciocalteu est communément acceptée pour la détermination du taux de polyphénols totaux, il n'y a pas de méthode unique en ce qui concerne le dosage des flavonoïdes totaux et plusieurs méthodes sont proposées. Woisky et Salatino ont décrit une méthode dans laquelle le chlorure d'aluminium (AlCl_3) formait des complexes jaunes avec les flavonoïdes en mesurant l'absorbance à 420 nm et en utilisant la quercétine comme standard⁴⁷. Cependant, tous les flavonoïdes ne réagissant pas de la même façon avec AlCl_3 , cette méthode semble peu adaptée à l'évaluation du taux de flavonoïdes totaux⁵⁵. Cette méthode a ensuite été modifiée, et seuls les flavones et les flavonols étaient évalués par complexation avec AlCl_3 alors que la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNP) était utilisée pour estimer les flavanones (et dihydroflavonols)^{56,57}. Ces méthodes sont rapides, peu chères et ne requièrent pas l'utilisation de nombreux standards analytiques, elles sont de ce fait largement utilisées dans la détermination des taux de flavonoïdes dans les fruits, légumes, céréales et plantes médicinales.

a) Dosage des flavones/ flavonols

La solution à tester, du méthanol ou éthanol 80%, une solution de chlorure d'aluminium et une solution d'acétate de potassium sont mélangés. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 415 nm^{8,23,56} ou 425 nm^{25,38,45}. Le standard utilisé pour l'établissement de la droite d'étalonnage est généralement la quercétine^{6,24,27}, mais cela peut également être le rutoside (quercétine glycosylée)⁴⁵, la galangine³⁸ ou encore un mélange de divers composés²⁵.

b) Dosage des flavanones/ dihydroflavonols

La solution à tester et une solution méthanolique acide de DNP sont chauffées à 50°C pendant 50 minutes. Après refroidissement, le mélange est dilué par une solution méthanolique d'hydroxyde

de potassium. L'absorbance est mesurée à 485 nm^{25,45} ou 495 nm^{23,56}. Pour ce dosage, pinocembrine^{25,38,45} et naringénine^{23,56} sont le plus souvent utilisées comme standards pour la construction de la droite d'étalonnage.

Les taux de flavones/flavonols et de flavanones/dihydroflavonols obtenus selon les deux méthodes décrites peuvent s'additionner afin d'estimer le taux de flavonoïdes totaux^{56,57}.

3.2. Techniques séparatives

3.2.1. Techniques de chromatographie

Plusieurs techniques chromatographiques sont utilisées pour l'analyse et l'isolement des composés contenus dans la propolis. Elles peuvent être couplées à un détecteur UV, le plus souvent de type barrette de diodes (DAD), mais également à un spectromètre de masse.

a) Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne ouverte (CC) a été utilisée, par exemple, il y a quelques années pour isoler des acides diterpéniques d'une propolis brésilienne⁵⁸ et, plus récemment, pour isoler des triterpènes, isoflavones, benzophénones et composés phénoliques contenus dans la propolis rouge du Brésil⁵⁹. Cela permet ainsi d'obtenir, à partir de la matrice complexe qu'est la propolis, des fractions contenant un nombre réduit de composés et de pouvoir relier ces derniers à des activités biologiques selon le procédé de fractionnement bioguidé⁶⁰.

b) Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est généralement utilisée pour comparer plusieurs échantillons de propolis, ou différents extraits ou fractions d'une même propolis^{38,61}. Certaines activités biologiques telles que les activités antifongiques et antibactériennes peuvent être directement déterminées sur des plaques CCM^{10,11}, les composés responsables de ces activités pouvant être purifiés par CCM préparative et identifiés par d'autres moyens. Cependant, l'utilisation de la CCM pour la caractérisation de la propolis est assez limitée, puisque le nombre de constituants est souvent élevé, et les standards commerciaux, pas toujours disponibles⁴³.

c) Chromatographie gazeuse

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est une technique particulièrement adaptée à l'analyse des huiles essentielles ou composés volatils contenus dans la propolis. Par exemple, Pino *et al.*⁶² ont identifié près de 100 composés volatils dans une propolis provenant du Yucatán au Mexique. Mais la plupart du temps, pour pouvoir analyser les composés plus

polaires que l'on retrouve dans les extraits alcooliques, il est nécessaire de les dériver avec du bis(triméthylsilyl)trifluoracétamide (BSTFA)^{38,42,44} afin de rendre ces composés, que l'on retrouve alors sous forme de composés mono, di et tri-triméthylsilylés, plus volatils ; les banques de spectres GC/MS disponibles facilitent alors l'identification des produits⁴³.

d) Chromatographie liquide haute performance

Les extraits de propolis étant très souvent solubles dans le méthanol, l'éthanol ou dans les solutions hydro-alcooliques, la chromatographie liquide haute performance (HPLC ou CLHP) en phase inverse est devenue la méthode chromatographique la plus utilisée pour l'analyse de la propolis, comme le montrent les nombreuses publications dans le domaine. En effet, les composés phénoliques absorbant dans l'UV peuvent facilement être détectés par un détecteur à barrettes de diodes^{22,28,32} afin d'obtenir leurs profils d'absorption. L'HPLC est également souvent couplée à la spectrométrie de masse (LC/MSⁿ), le mode d'ionisation le plus répandu étant l'ionisation électrospray (ESI)^{29,32,36}. Ainsi, Midorikawa *et al.* ont proposé une méthode de LC/MS adaptée à la propolis brésilienne leur permettant d'identifier 41 composés (acides dicaféoylquiniques, diterpènes, flavonoïdes et composés phénoliques prénylés)⁴⁶ tandis que Pelatti *et al.* se sont intéressés à l'analyse d'une propolis italienne (type peuplier) en identifiant 40 composés (flavonoïdes, acides et esters phénoliques)⁶³.

3.2.2. Autre technique employée

L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) est basée sur les différences de mobilité des composés en fonction de leur charge et de leur taille. Ainsi, Volpi a pu séparer 12 flavonoïdes, deux acides phénoliques et un stilbène par cette technique⁶⁴. Cependant, l'électrophorèse capillaire reste encore très peu utilisée par rapport aux autres techniques⁴¹. En effet, comme les flavonoïdes sont légèrement acides, leur séparation nécessite l'utilisation d'un tampon basique (pH > 10) pour être réellement efficace⁶⁵. Et certains flavonoïdes, tels que la quercétine ou la myricétine, ont tendance à se décomposer dans de tels milieux basiques⁶⁶. La chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), utilisant des tensioactifs comme le dodécyl sulfate de sodium dans le tampon, peut alors être une alternative pour la séparation de composés neutres et notamment de flavonoïdes contenus dans des miels par exemple⁶⁶.

3.3. Techniques d'identification

3.3.1. Spectrométrie de masse en injection directe

La spectrométrie de masse en injection directe (ou infusion) peut être utilisée comme méthode rapide de screening, capable de caractériser des échantillons de propolis de différentes origines géographiques (et donc de compositions différentes). La majorité des composés d'intérêt contiennent des groupements phénoliques, c'est donc l'ionisation électrospray en mode négatif [ESI(-)-MS] qui

donne les meilleures réponses, comme le montrent Sawaya *et al.* dans leur étude de plusieurs propolis issues de différentes régions du monde⁶⁷. Dans cette étude, des différences entre une propolis verte du Sud-Est, une propolis marron du Sud et deux types de propolis rouge collectées au Nord-Est du Brésil, par exemple, ont été relevées dans les profils ESI(-)-MS de chaque échantillon. Cette technique peut également servir à comparer différents extraits ou fractions d'une même propolis^{6,15}. La spectrométrie de masse en infusion est aussi utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un composé purifié notamment grâce à la haute résolution (HRESIMS dans le cas de l'ionisation électrospray). Une autre source d'ionisation a également été utilisée par Pietta *et al.*, l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), pour comparer également plusieurs échantillons de propolis⁶⁸.

3.3.2. Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique non destructrice capable de donner des informations sur la structure chimique des composés. Elle est généralement employée pour un composé purifié afin d'obtenir sa structure précise à l'aide des spectres RMN 1D (¹H et ¹³C) et 2D (COSY, HMQC, HMBC, NOESY, etc.). Elle est indispensable dans le cas d'identification de composés nouveaux^{31,69,70}. Pour la première fois, Bertelli *et al.* ont utilisé la RMN ¹H pour identifier des composés phénoliques et flavonoïdes contenus directement dans des extraits de propolis⁷¹ (ces composés de références ayant tout de même été analysés au préalable séparément par cette même technique).

4. Diversité chimique et origine botanique de la propolis

Depuis une quarantaine d'années, la propolis a fait l'objet d'intenses études phytochimiques et pharmacologiques, et de nombreuses analyses de propolis provenant de différentes origines géographiques ont montré que la composition chimique, mais aussi les activités biologiques de la propolis apparaissaient très variables, voire totalement différentes⁷².

4.1. Variabilité de la propolis

Afin de mieux comprendre les causes de la variabilité de la composition de la propolis, il est important de savoir comment elle est fabriquée et d'où elle provient. Les abeilles vont collecter des substances sécrétées par les plantes mais aussi celles exsudées lors de blessures de ces dernières: il s'agit de matières lipophiles contenues dans les feuilles, les bourgeons, les gommés ou encore les résines auxquelles elles ajoutent cires et sécrétion enzymatiques contenues dans leur salive. Ainsi la composition de la propolis dépend-elle directement de la flore locale au niveau des sites de collecte et donc des caractéristiques géographiques et climatiques de ces régions. Ceci engendre donc une réelle diversité de composition chimique, tout spécialement dans les régions tropicales⁷².

4.2. Composition chimique et source végétale

Aujourd'hui, nous disposons de beaucoup d'informations sur la propolis provenant des zones tempérées de chaque hémisphère (Europe, Amérique du nord, Asie non tropicale), dont il ressort que la principale source de propolis dans ces régions est l'exsudat résineux des bourgeons de différents peupliers : espèce *Populus* section *Aigeiros* (Salicaceae), et principalement le peuplier noir (*Populus nigra* L.)² (Figure I-1). La propolis européenne contient ainsi les composés phénoliques typiques du bourgeon de peuplier *i.e.* flavonoïdes aglycones [dont flavones et flavanones typiques avec un cycle B sans substituant [pinocembrine, pinobanksine, galangine et chrysine (composé **1**)], mais aussi des acides et esters phénoliques (comme le caféate de phényléthyle (CAPE) (**2**)]^{73,74}. Les peupliers sont très courants dans les zones tempérées, mais absents des régions tropicales et subtropicales. Pour cette raison, il semblerait que les abeilles doivent trouver une autre source de propolis afin de remplacer leur peuplier "adoré"⁷²; les propolis des régions tropicales possèdent donc des compositions chimiques différentes de celle du type peuplier des zones tempérées.

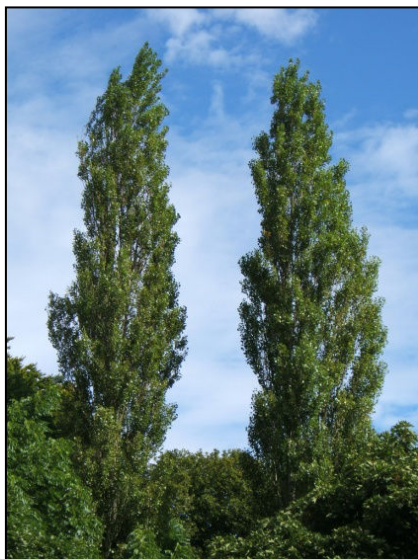


Figure I-1. Peuplier noir (*Populus nigra*)

(Source http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/da/Populus_nigra_Plantierensis1.jpg)

Dans les années 2000, la propolis du Brésil a suscité un grand intérêt, tant au niveau scientifique que commercial. La propolis verte en est le type le plus répandu, notamment dans le Sud-Est du pays. La principale source de cette propolis s'est révélée être la résine contenue dans les feuilles et les bourgeons d'une plante endémique de cette région localement nommée "alecrim-do-campo" (le romarin des champs) ou *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae)^{75,76} (Figure I-2). Les principales familles chimiques rencontrées dans cette propolis sont les dérivés prénylés de l'acide *p*-coumarique [comme l'artépilline C (**3**)]⁷⁷ et les acides caféoylquiniques (**4**)⁷⁸.



Figure I-2. "Alecrim-do-campo" (*Baccharis dracunculifolia*)

(Source https://c2.staticflickr.com/8/7285/9215201399_9775d9e62d_m.jpg)

Des benzophénones prénylées [comme la némososone (**5**)] ont quant à elles été retrouvées dans des propolis du Venezuela⁷⁹, de Cuba⁸⁰, de l'Amazonie brésilienne⁸¹ et du Nord-Est du Brésil^{59,82}. A Cuba et au Venezuela, la principale source botanique est la résine provenant des exsudats de fleurs de *Clusia* (*Clusia rosea*)^{79,83} (Figure I-3) de la famille des Clusiaceae. Il s'agit probablement du même

type de plante au Brésil car plusieurs espèces de *Clusia* brésiliennes produisent des résines contenant des benzophénones similaires⁸⁴.

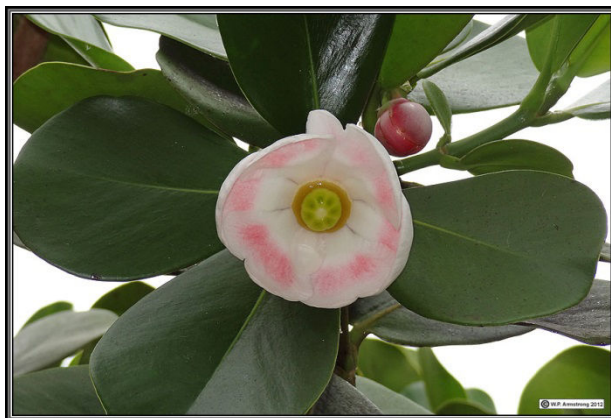


Figure I-3. Fleur de *Clusia* (*Clusia rosea*)

(Source <http://waynesword.palomar.edu/images2/ClusiaRosea1b.jpg>)

Des géranylfavanones (comme le composé **6**) ont été rencontrées dans des propolis provenant de la région Pacifique, à Taïwan⁸⁵ et Okinawa^{86,87}. Plus récemment, des composés similaires ont été retrouvés dans des propolis provenant d'Afrique, plus particulièrement en Egypte⁸⁸ et au Kenya⁶⁹. La propolis d'Okinawa provient de l'exsudat du fruit de *Macaranga tanarius*⁸⁷ (Figure I-4) de la famille des Euphorbiaceae, mais il existe plus de 280 espèces de *Macaranga*, de l'Ouest de l'Afrique jusqu'aux îles du Pacifique Sud⁸⁹, dont certaines produisent des dérivés géranylés. Il n'est donc pas anormal que des propolis d'Afrique, du Japon et de Taïwan présentent des compositions similaires.

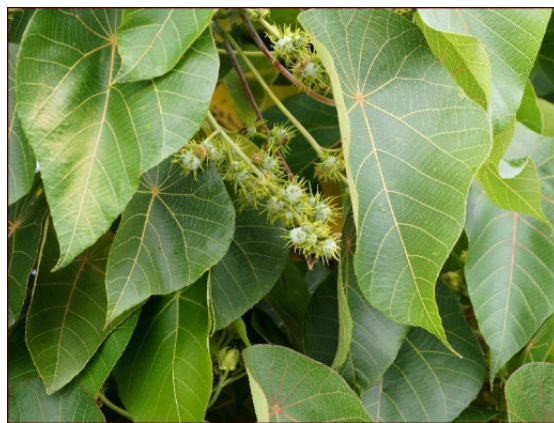


Figure I-4. *Macaranga tanarius*

(Source https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQGdBk1_yNI4OC23r9_siwgSikp1gcd_IOIH3_Seh-2K25cxyO2)

Des propolis provenant des régions Est de la méditerranée, telles que la Grèce, Chypre, la Crête et la Turquie peuvent principalement contenir soit des diterpènes [comme l'acide isocupressique (7)] soit des anthraquinones [comme le chrysophanol (8)]^{42,90}. Alors que la source diterpénique semble correspondre à différentes Cupressaceae (Figure I-5), très cultivées dans cette région et de composition distincte des Pinaceae⁹¹, aucune suggestion n'a encore été proposée concernant la source botanique des anthraquinones.



Figure I-5. Exemple de Cupressaceae

(ici *Chamaecyparis lawsoniana*, source <http://www.plantes-shopping.fr/medias/boutique/chamaecyparis-lawsoniana-pottenii/details-feuillage.jpg>)

Ainsi, Salatino *et al.* ont répertorié cinq grands types de propolis (I-V) en fonction de leurs composition chimique et localisation géographique⁵ (Figure I-6).

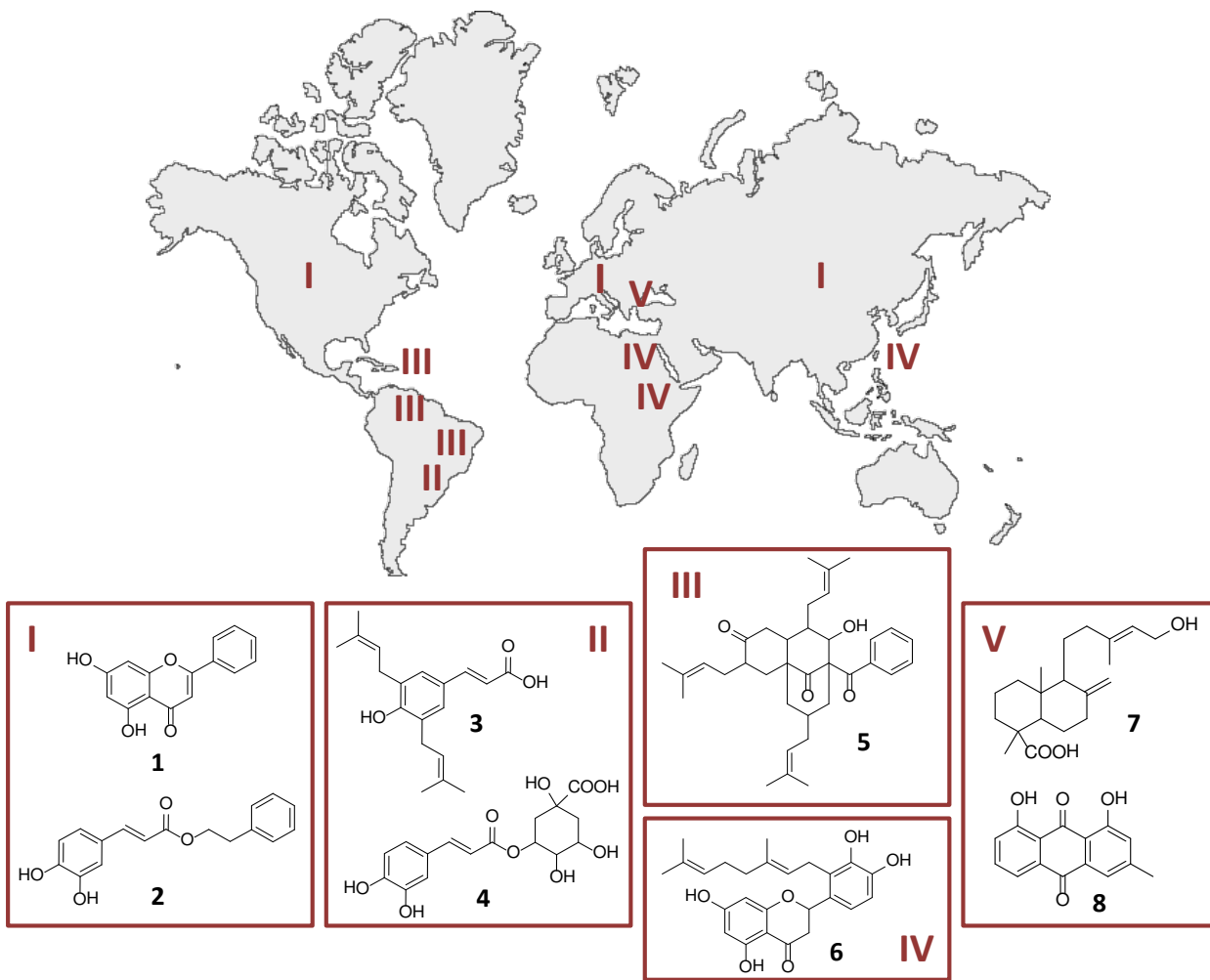


Figure I-6. Distribution géographique des cinq types de propolis. I : type propolis de peuplier des zones tempérées contenant des flavonoïdes (chrycine, 1) et des esters hydroxycinnamiques [caféate de phényléthyle (CAPE), 2]. II : type propolis verte du Brésil avec des dérivés prénylés d'acides *p*-coumariques (artépilline C, 3) et des acides caféoylquiniques (4). III : propolis type *Clusia* avec des benzophénones polyprénylées (némorosone, 5). IV : propolis type *Macaranga* avec des flavonoïdes géranylés (6). V : propolis type méditerranéen (Grèce, Chypre, Crète, Turquie) avec soit des diterpènes (acide isocupressique, 7) soit des anthraquinones (chrysophanol, 8). [d'après Salatino *et al.*, 2011⁵]

Le tableau I-1 rassemble l'étude des différentes propolis entreprises à ce jour par rapport à leurs composés majoritaires et leurs probables sources végétales. On remarquera que ce tableau présente des familles chimiques absentes de la classification proposée par Salatino *et al.* (2011). C'est le cas des lignanes, phénylpropanoïdes notamment très répandus chez certaines plantes alimentaires (céréales, fruits, légumes et légumineuses)⁹². On retrouve ces lignanes dans des propolis provenant du Chili, des Iles Canaries ou encore du Kenya.

Tableau I-1. Exemples de types de propolis avec leur origine botanique et leur composition chimique
(adapté de Salatino *et al.*, 2011⁵)

Région géographique	Type de propolis et/ou couleur	Source végétale possible	Composés chimiques majoritaires	Réf
Zones tempérées	Type I	<i>Populus</i> section <i>Aigeiros</i>	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, esters caféïques	2
Amérique du Sud				
Brésil, Sud	-	<i>Araucaria</i> spp.	Diterpènes	58
Brésil, centre et Sud-Est	Type verte II	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	acides hydrocinnamiques prénylés, acides caféoylquiniques, diterpènes	75,76,78
Brésil, Nord-Est	Rouge	<i>Dalbergia ecastophyllum</i> , <i>Clusia</i> spp. (?*)	Isoflavonoïdes, néoflavonoïdes, lignanes, benzophénones polyprénylées	59,93,94
Brésil, Nord-Est	Type III	<i>Clusia</i> spp.	Benzophénones polyprénylées	82
Brésil, Amazonie	Type III	<i>Clusia</i> spp.	Benzophénones polyprénylées, triterpénoïdes	81
Argentine, Tucuman	-	<i>Zuccagna punctana</i>	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, 8-méthoxyflavanones, chalcones	32
Chili	-	-	Lignanes	95
Cuba	Rouge	Légumineuse	Isoflavonoïdes	83
Cuba	Jaune	inconnue	Flavonoïdes polyméthoxylés, triterpénoïdes	80
Cuba	Type III (marron)	<i>Clusia</i> spp.	Benzophénones polyisoprénylées	80,83
Vénézuela	Type III	<i>Clusia</i> spp.	Benzophénones polyisoprénylées	79
Colombie	-	Conifères(?)	Diterpènes (labdanes)	96
Amérique centrale et du Nord				
Salvador	-	Conifères(?)	Labdanes glycosylés, chalcones	97
Mexique	Type I	<i>Populus</i> spp.	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, esters hydroxycinnamiques	31
Canada	Type I	<i>Populus</i> spp.	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, esters hydroxycinnamiques et p-hydroxyacétophénone	98
Etats-Unis	-	-	Flavonoïdes	99
Afrique				
Iles Canaries	-	-	Lignanes	100
Kenya	Type IV	<i>Macaranga</i> spp.	Lignanes, géranylstilbènes, géranylflavonoïdes	69
Egypte	Type IV	<i>Macaranga</i> spp.	Géranylflavanones	88
Europe				
Méditerranée (Bulgarie, Grèce, Algérie, Turquie)	Type I	<i>Populus</i> section <i>aigeiros</i>	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, esters caféïques et féruliques	101
Méditerranée (autour Sicile)	Type V	<i>Cupressus sempervirens</i>	Diterpènes	4,102
Turquie	Types I et V (?)	<i>Populus alba</i> , <i>P. tremuloïdes</i> , <i>Salix alba</i>	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, vanilline, bisabolol, chrysophanol (anthraquinone)	90
Grèce, Chypre, Crète	Types I et V (?)	<i>Populus</i> spp., Cupressaceae	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, diterpènes, anthraquinones	42,91
Pays Bas	Type I	<i>Populus</i> spp.,	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, esters de glycérols et d'acides cinnamiques	103

Tableau I-1. (suite)

Région géographique	propolis type et/ou couleur	Source végétale possible	Composés chimiques majoritaires	Réf
Asie				
Jordanie	-	-	Triterpènes (lanostanes)	104
Oman	-	<i>Azadiracta indica</i> , <i>Mangifera indica</i> , <i>Acacia</i> spp.	Flavanones prénylés, triterpènes, chalcones	105
Népal	-	Légumineuse	Isoflavones, néoflavonoïdes, dihydroflavonols, flavanols	106–108
Birmanie	-	inconnue	Triterpènes (cycloartanes), flavanones prénylées	109
Thaïlande	-	<i>Styrax</i> spp.	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, esters caféïques et féruliques	70
Indonésie (Java)	Type IV (?)	<i>Macaranga tanarius</i> , <i>Mangifera indica</i>	Flavanones prénylés, triterpènes (cycloartanes), résorcinols	110
Taïwan	Type III	<i>Macaranga</i> spp.	Géranylflavanones	85
Chine	Type I	<i>Populus</i> spp.	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué	111
Corée	Type I	<i>Populus</i> spp.	Flavonoïdes avec cycle B non-substitué, esters caféïques	112
Corée (île de Jeju)	-	inconnue	Chalcones	113
Japon (région d'Akita)	Type I	<i>Populus</i> spp.	Esters caféïques	114
Japon, Okinawa	Type IV	<i>Macaranga tanarius</i>	Prényl et géranylflavanones	86,87,115
Russie	-	Bouleau (<i>Betula verrucosa</i>)	Flavonoïdes (différents du peuplier)	4,116

* Des interrogations persistent encore

Les Légumineuses (famille des Fabaceae) sont également des sources de résines de propolis : les isoflavonoïdes et néoflavonoïdes de la propolis rouge du Brésil proviennent de la résine de *Dalbergia ecastophyllum*⁹³ alors que ceux de la propolis népalaise semblent provenir de *Dalbergia sisoo*^{106,107}. La composition de la propolis rouge de Cuba laisse supposer que des légumineuses puissent en être la source. La propolis provenant de Tucumán, en Argentine, contient des méthoxyflavanones, des chalcones et des flavonoïdes dont le cycle B est non-substitué, plutôt caractéristiques du type peuplier, mais cette propolis semble cependant être issue de la légumineuse *Zuccagnia punctana*³². Les propolis provenant de Birmanie et de l'île de Java (Indonésie) contiennent des triterpénoïdes de type cycloartanes et des flavanones prénylées qui proviennent probablement de *Macaranga tanarius* et *Mangifera indica*¹¹⁰. Les diterpènes sont fréquemment rencontrés dans la propolis et ceux contenus dans la propolis grecque semblent provenir de Cupressaceae⁹¹ ; mais d'autres conifères, comme certaines espèces d'*Araucaria*, représenteraient une source possible de diterpènes dans le Sud du Brésil⁵⁸ alors que, dans le centre et le Sud-Est¹¹⁷ les mêmes composés auraient pour source *Baccharis dracunculifolia*. Les origines botaniques de certaines substances comme les anthraquinones des propolis grecque et turque, celles contenues dans la propolis jaune de Cuba ou encore les chalcones de l'île de Jeju, au Japon, restent encore inconnues. Il faut préciser que

l'identification d'une source végétale peut s'avérer difficile, puisqu'il y a souvent plus d'une origine possible pour une seule propolis. C'est le cas pour les propolis provenant de Grèce et des îles voisines (comme Chypre ou la Crête) : beaucoup d'échantillons contiennent des flavonoïdes de type peuplier, accompagnés d'antraquinones ou d'autres substances dont l'origine botanique est inconnue⁴². De même, en plus des substances provenant de *Dalbergia ecastophyllum*, la propolis rouge du Brésil contient des benzophénones prénylées typique des Clusiaceae⁵⁹.

C'est la raison pour laquelle, en dépit des nombreuses études menées de par le monde depuis une quarantaine d'années, de nouvelles molécules sont régulièrement identifiées de nos jours dans des propolis de diverses origines géographiques. Ainsi, de nouveaux flavonoïdes avec un cycle B non-substitué, caractéristiques des espèces de *Populus* section *Aigeiros*, ont été caractérisés récemment : c'est le cas de la pinobanksine-3-(2-méthyl)butyrate (**9**) et de la 6-cinnamylchrysin (**10**) provenant d'une propolis chinoise¹¹¹ ou encore celui d'un dérivé phénylallylique de la galangine (**11**) provenant d'une propolis mexicaine³¹ (Figure I-7) .

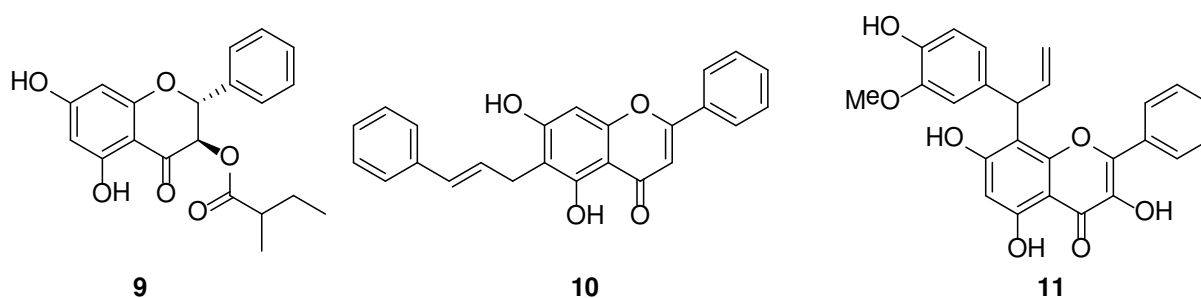


Figure I-7. Nouveaux flavonoïdes de la propolis de type peuplier (Type I)

De nouvelles substances ont également été identifiées dans la propolis verte du Brésil. Elles sont structurellement apparentées à l'artépilline C (**3**) : il s'agit d'un ester d'artépilline C (**12**)¹¹⁸, d'un "dimère" hétérocyclique comprenant deux motifs d'artépilline C (**13**)¹¹⁸ et d'un chromane présentant également le squelette carboné de **3** (**14**)¹¹⁹ (Figure I-8).

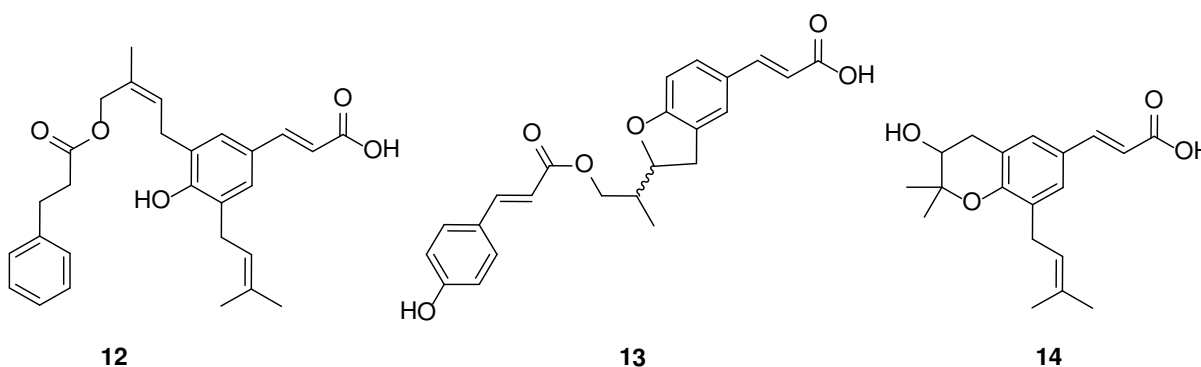


Figure I-8. Nouveaux dérivés de l'artépilline C isolés de la propolis verte du Brésil (Type II)

C'est aussi le cas de nouvelles benzophénones polyprénylées proches de la némorosone (**5**), la 18-éthoxy-17-hydroxy-17,18-dihydroscrobiculatone (**15**, propolis vénézuélienne¹²⁰) et la propolone D (**16**, propolis cubaine⁸⁰) (Figure I-9).

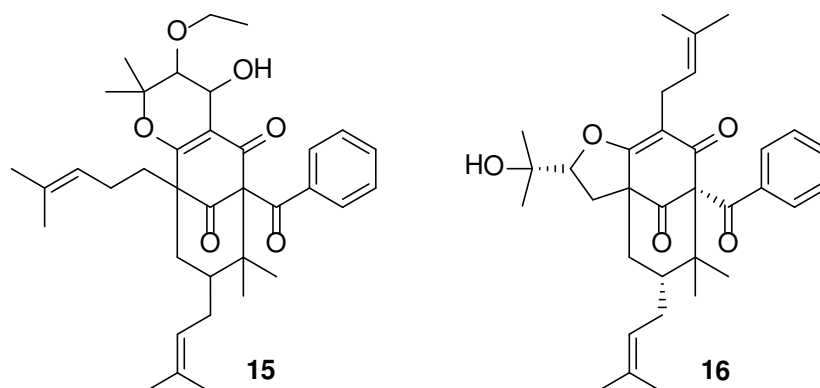


Figure I-9. Nouvelles benzophénones polyprénylées isolées de propolis tropicale (Type III)

De nouvelles flavanones contenant des groupements géranyles ont été identifiées dans des propolis de type IV, issues de différentes espèces de *Macaranga*. Il s'agit par exemple du nymphaeol C (**17**) et du nymphaeol A (**18**) provenant de la propolis d'Okinawa au Japon⁸⁶. Un autre composé a également été caractérisé, il s'agit d'un stilbène géranylé, la schweinfurthine A (**19**), provenant d'une propolis kenyane⁶⁹ (Figure I-10).

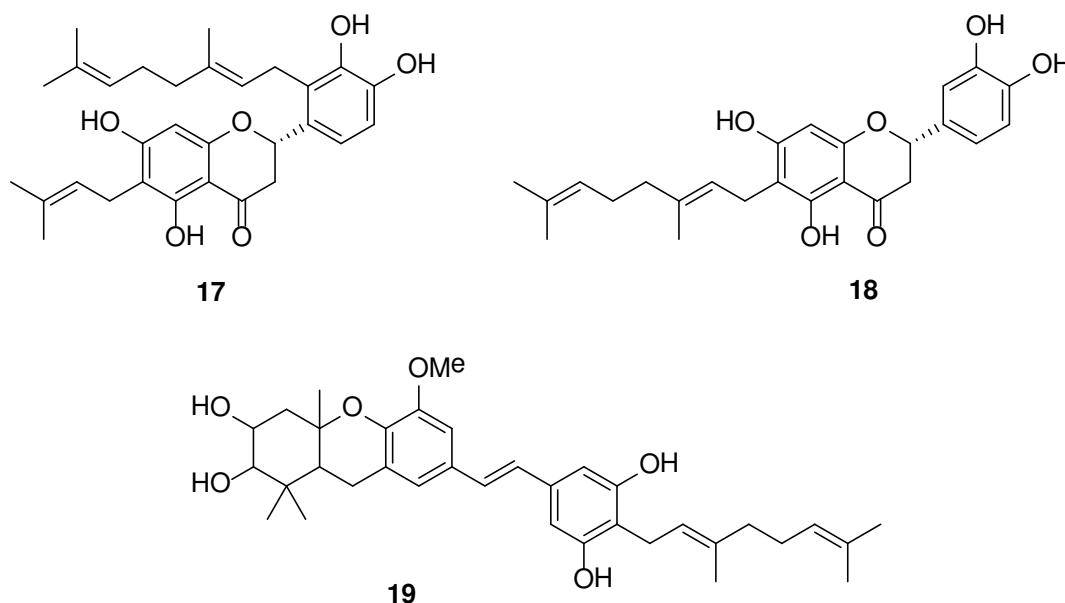


Figure I-10. Flavanones (**17-18**) et stilbène géranylés (**19**) des propolis de type IV

Enfin, de nouveaux néoflavonoïdes ont été identifiés récemment, dont deux à chaîne ouverte provenant de la propolis népalaise (**20**)¹⁰⁶ ou encore de la propolis rouge du Brésil (**21**)¹²¹. A côté de ces néoflavonoïdes, de nouveaux isoflavonoïdes tels le composé **22** provenant de la propolis du Népal¹⁰⁸ et le (6aS,11aS)-6a-éthoxymédicarpone (**23**) de la propolis rouge du Brésil¹²¹ ont été identifiés (Figure I-11).

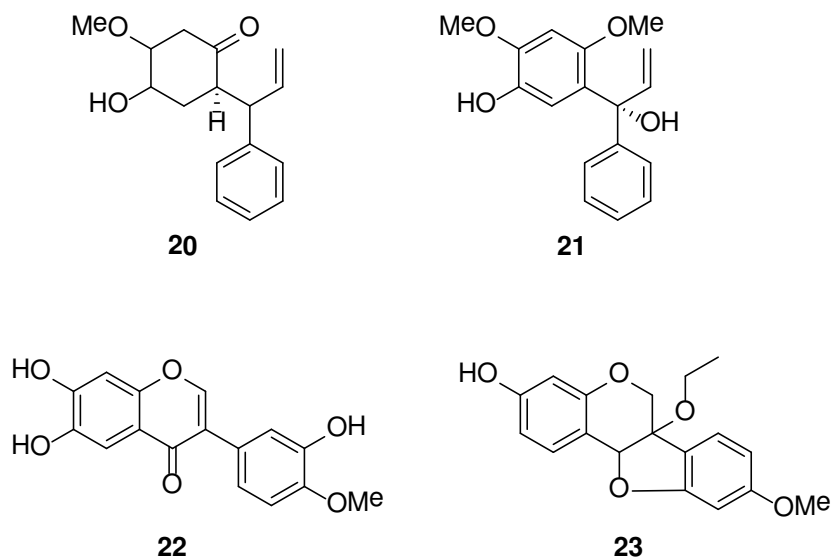


Figure I-11. Néoflavonoïdes et isoflavonoïdes provenant de propolis népalaise et brésilienne^{106,108,121}

La propolis recèle donc une très grande diversité de composés chimiques, ce qui entraîne par le fait, des propriétés pharmacologiques différentes. Dans l'optique d'une valorisation biologique du produit, il sera donc nécessaire de caractériser et classer voire standardiser la composition de chaque type de propolis utilisée¹²².

4.3. Vers une standardisation ?

Est-il possible de standardiser une matière de composition aussi variable que la propolis ? De façon évidente, une standardisation universelle, globale, de "LA" propolis est impossible en raison de la diversité chimique de la propolis observée dans les diverses zones géographiques. Par contre, certains auteurs tels que Bankova¹²² proposent une standardisation associée à chaque type de propolis, et notamment à celui de type peuplier (type européen) qui est de très loin le matériau le plus étudié, tant au niveau phytochimique que pharmacologique. Il apparaît alors indispensable que les utilisateurs de propolis (producteurs et transformateurs) disposent d'une méthodologie simple de profilage du produit. En se basant sur des connaissances chemotaxonomiques antérieures⁷⁴, Bankova *et al.* ont ainsi développé une méthode simple d'identification par CCM, en utilisant comme marqueurs sept composés phénoliques caractéristiques des bourgeons de peuplier (pinostrobin, pinocembrine, férulate de benzyle, galangine, chrysin, CAPE et kaempférol). Cette méthode permet très clairement de différencier les propolis de type peuplier des autres³⁸. Une fois la propolis identifiée

comme étant de type peuplier, il est nécessaire de quantifier les différents principes actifs présentant diverses activités biologiques. Il a cependant été montré, dans le cas des propolis, qu'une activité donnée était difficilement attribuable à un seul composé¹². Il est donc préférable de quantifier des familles de composés présentant des structures chimiques, et donc des bio-activités, proches. Ainsi, la composition chimique d'une propolis de type peuplier est caractérisée, comme on l'a dit précédemment, par trois paramètres : les taux de polyphénols totaux, de flavones/flavonols et de flavanones/dihydroflavonols. Des procédures spectrophotométriques, rapides et bon marché, ont donc été mises en place permettant la quantification de ces trois groupes de composés. Le taux de polyphénols totaux est déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu, celui des flavones/flavonols par la méthode de complexation avec le chlorure d'aluminium, et celui des flavanones/dihydroflavonols par la méthode avec la DNP²⁵. Une fois ces méthodes validées, Popova *et al.* ont réalisé une étude statistique sur 114 propolis provenant de différentes régions d'Europe et du Moyen-Orient. Cette étude a permis l'établissement d'un profil type pour les propolis de type peuplier, avec des valeurs minimum de 45% de rendement en extrait alcoolique, 21% de polyphénols totaux, 4% de flavones/flavonols et 4% de flavanones/dihydroflavonols, et une valeur maximum de concentration minimale d'inhibition (CMI) contre *Staphylococcus aureus* de 250 µg/ml. Une corrélation négative significative a été démontrée entre le taux de polyphénols totaux et la CMI à l'égard de *S. aureus*, montrant ainsi que le choix de ces critères était judicieux. Bien entendu, ces méthodes de caractérisation et d'évaluation de la qualité de ce matériau sont valables pour la propolis de type peuplier, et ne peuvent être appliquées à d'autres types tels que la propolis verte du Brésil ou la propolis rouge de Cuba par exemple¹²³. Des études restent alors à être menées afin de standardiser également les autres types de propolis.

5. Activités biologiques associées à la propolis

De nombreuses activités biologiques sont attribuées à la propolis, nous allons nous intéresser à celles qui ont fait l'objet de plusieurs d'études scientifiques (liste non exhaustive).

5.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé ou d'un extrait correspond à sa capacité à diminuer ou à empêcher les réactions d'oxydation. Les antioxydants naturels les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés (poly)phénoliques en général¹²⁴. Plusieurs études ont montré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec sa teneur en polyphénols^{23,45,125}. Ainsi, la propolis de type peuplier des zones tempérées, plus riche en polyphénols, possède un potentiel antioxydant supérieur à celui de la propolis verte du Brésil, par exemple⁵¹. Les composés phénoliques responsables de cette activité sont principalement le caféate de phényléthyle (CAPE), le kaempférol mais aussi les acides cinnamiques : caféique, p-coumarique et férulique^{24,51,112}. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer *in vitro* l'activité antioxydante de la propolis : par piégeage de radicaux différents, comme les radicaux libres DPPH° (diphénylpicrylhydrazyle)^{23,24,33,45}, les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter)^{6,26,37,42}, les radicaux ABTS° (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)^{23,24,112}, les peroxydes ROO° par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)^{126,127} et superoxydes O₂^{°-8,128}. Le pouvoir antioxydant de la propolis peut également être évalué par électrochimie, au moyen de la voltammétrie cyclique^{26,37}, en comparant le profil du voltammogramme de la propolis, et notamment la vague d'oxydation irréversible caractéristique des antioxydants, par rapport à un standard, généralement l'acide ascorbique et/ou l'acide gallique.

5.2. Activité antifongique

La propolis montre une activité antifongique dirigée contre de nombreuses levures : plusieurs espèces de *Candida*^{9,10,12}, de *Saccharomyces* et de *Cryptococcus*³². Elle est également efficace contre des champignons filamenteux comme certaines espèces d'*Aspergillus*^{35,122}, de *Microsporium*^{32,130} et de *Trichophyton* (dermatophytes)^{131,132}. Une étude menée par Murad *et al.* a montré un effet coopératif de la propolis pour lutter contre une souche mycosique d'Amérique du Sud (*Paracoccidoides brasiliensis*) en stimulant l'activité fongicide des macrophages¹³³. Les flavonoïdes ainsi que les esters phénoliques (caféates et férulates) semblent être responsables de cette activité¹².

5.3. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de la propolis et de ses constituants est l'une des propriétés les plus largement étudiées. Cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram positif et Gram négatif (de type anaérobie et aérobie) mais avec cependant une plus grande efficacité sur les souches Gram(+). Parmi les bactéries dont la croissance est inhibée, on retrouve principalement des *Staphylococcus* (le plus généralement *aureus*)^{12,134}, des *Streptococcus* (*mutans* et *sanguinis*)¹³⁵ et des *Bacillus* (*subtilis*)¹³⁶ pour les Gram(+) et des *Pseudomonas* (*aeruginosa*)¹³⁷, des *Listeria* (*monocytogenes*)¹³⁸, *Escherichia Coli*^{12,60}, *Porphyromonas gingivalis*⁶¹ et *Helicobacter pylori*^{139,140} pour les Gram(-), autant de souches impliquées dans les troubles des sphères otorhinopharyngées, gastro-intestinales, génitales ou buccales^{12,90,141}. Certaines études ont montré que des souches résistantes aux antibiotiques étaient sensibles à la propolis^{11,60}. Il a également été montré que la propolis, lorsqu'elle est prise en association avec certains antibiotiques (comme l'amoxicilline, l'ampicilline, la gentamycine, le chloramphénicol, etc.), augmente l'efficacité de ces derniers¹⁴²⁻¹⁴⁴.

5.4. Activité antivirale

Des études ont montré que la propolis et ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : myxovirus, poliovirus, coronavirus, rotavirus et adénovirus^{12,145}. Ainsi, la propolis et certains de ses constituants (apigénine, chrysin) possèdent un effet prophylactique contre le virus de la grippe, en atténuant les symptômes à travers une action antineuraminidase¹⁴⁶. La propolis de type peuplier, et notamment l'un de ses composés majoritaires, le CAPE, possède un effet anti-VIH (comme agent anti-intégrase du virus)¹⁴⁷ et un effet additif avec l'azidothymidine (AZT), aussi connu sous le nom de zidovudine (ZDV), qui est un inhibiteur de la transcriptase inverse¹⁴⁸. Les extraits aqueux et alcooliques de propolis ont également une action antivirale contre l'herpès génital (herpès simplex virus de types 1 et 2)^{13,145}.

5.5. Activité anti-inflammatoire

La propolis possède un effet anti-inflammatoire significatif sur différents modèles *in vivo* d'arthrite, d'œdème de la patte ou d'inflammation chronique ou aiguë¹⁴. Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés : inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire (IL-6) et inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxydase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase). Le CAPE s'est révélé être le composé possédant le plus fort effet inhibiteur sur l'activité des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2, évalué par la production de prostaglandines pro-inflammatoires¹⁴⁹.

5.6. Activité immunomodulatrice

La propolis possède une action immunomodulatrice *in vitro* et *in vivo* sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise^{150,151}. Elle stimule le pouvoir de présentation des macrophages, l'activité lytique des macrophages et des "natural killers" contre les cellules tumorales. Elle augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes^{152,153}. Il a également été montré que la propolis exerçait une activité antiallergique, notamment grâce à la chrysrine et au kaempférol, identifiés comme étant les composés les plus antiallergiques contenus dans les extraits alcooliques de propolis¹⁵⁴. Un essai clinique réalisé par Khayyal *et al.* a montré que la prise orale quotidienne de propolis pendant deux mois avait réduit le nombre et la sévérité des crises nocturnes et avait amélioré les fonctions ventilatoires chez les patients souffrants d'asthme¹⁵⁵. En parallèle, ces mêmes auteurs ont constaté une diminution des prostaglandines, des leucotriènes et des cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une augmentation des cytokines anti-inflammatoires.

5.7. Activité antitumorale

De très nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées sur l'activité antitumorale de la propolis et de ses principaux constituants^{153,156}. Les résultats montrent un effet antiprolifératif vis-à-vis d'un très grand nombre de lignées tumorales (sang, peau, côlon, sein, poumon, pancréas, foie, rein, prostate, cerveau)¹⁵⁷. Par exemple, Li *et al.* ont montré l'effet cytotoxique d'une propolis mexicaine (région de Sonora) contre six lignées de cellules cancéreuses : 26-L5 (carcinome du côlon), B16-BL6 (mélanome murin), LLC (carcinome pulmonaire de Lewis), A549 (adénocarcinome pulmonaire humain), HeLa (adénocarcinome humain du col de l'utérus) et HT-1080 (fibrosarcome humain)³¹. Szliszka *et al.* ont montré, quant à eux, le rôle important de la propolis verte du Brésil et de ses constituants biologiquement actifs dans la chémoprévention du cancer de la prostate par le biais de l'augmentation de l'apoptose induite par la cytokine TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)³⁰. Valente *et al.* ont prouvé que la propolis portugaise avait un effet anticancéreux contre les carcinomes rénaux humains (RCC), et qu'elle pouvait, par ailleurs, à de très faibles concentrations, réduire ou inhiber la peroxydation lipidique et l'hémolyse induite par les peroxydes¹⁵⁸. Parmi les constituants de la propolis responsables de l'activité anticancéreuse, on retrouve les flavonoïdes tels que la chrysrine, des dérivés de galangine et de catéchine^{31,159,160}, des terpènes tels que des triterpènes de type cycloartane¹⁰⁹, diterpènes contenus dans la propolis grecque¹⁶¹ ou encore le CAPE (caféate de phényléthyle)¹⁶²⁻¹⁶⁹.

5.8. Autres activités

On attribue également à la propolis un effet régénérateur de tissus¹⁷. Une étude réalisée par Ozturk *et al.* a montré que la propolis facilitait la cicatrisation des plaies de la cornée épithéliale de rats¹⁷⁰. La propolis verte du Brésil aurait également des propriétés anti-ulcérales¹⁷¹, tout comme *Baccharis dracunculifolia*, la source végétale de cette propolis¹⁷². Des études *in vitro* et *in vivo* menées par Pontin *et al.* ont montré que la propolis verte du Brésil possédait également une activité antileishmanienne¹⁷³.

5.9. Effets indésirables – toxicité

La toxicité de la propolis est très faible. Chez le rat, la DL₅₀ (dose létale médiane) d'un extrait concentré de propolis a été évalué à 15 g/kg^{1,17}. L'AFSSA (saisine 2007-SA-0231) rapporte que la dose la plus élevée sans effets indésirables (NAOEL) est de 1.4 g/kg chez l'animal et qu'une supplémentation de 1.95 g/jour pendant 30 jours n'a pas entraîné d'effets indésirables chez l'homme¹⁷⁴. Cependant, il peut exister des cas d'allergies de contacts (dermatose, eczéma) avec un allergène bien identifié : le caféate de prényle^{175,176}.

Bibliographie du chapitre I (17-176)

- (17) Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia* **2002**, *73*, Supplement 1, S1–S6.
- (18) Donadieu, Y. *Naturellement vôtre avec ... La propolis*; Naturellement vôtre avec...; Dangles.; France, 2008.
- (19) Chauvin, R. *Traité de biologie de l'abeille*; Masson, 1968.
- (20) Aagaard, K. L. *The Natural Product: Propolis, the Way to Health*; Mentor: Danemark, 1974.
- (21) Coneac, G.; Gafitanu, E.; Hadaruga, N. G.; Hadaruga, D. I.; Ravis, A.; Bandur, G.; Pinzaru, I. A.; Rusu, G.; Ursica, L.; Paunescu, V.; Gruia, A.; Sebesan, M.; Grozescu, I.; Lazau, C.; Sfirloaga, P. Propolis extract/beta-cyclodextrin nanoparticles: synthesis, physico-chemical, and multivariate analyses. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* **2008**, *14*, 58–70.
- (22) Biscaia, D.; Ferreira, S. R. S. Propolis Extracts Obtained by Low Pressure Methods and Supercritical Fluid Extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *51*, 17–23.
- (23) Bonvehí, J.; Gutiérrez, A. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2011**, *88*, 1387–1395.
- (24) Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Usui, Y.; Nakamura, J.; Matsuka, M.; Zhu, F.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1383–1392.
- (25) Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A. G.; Marcazzan, G. L.; Bogdanov, S. Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochemical Analysis* **2004**, *15*, 235–240.
- (26) Laskar, R. A.; Sk, I.; Roy, N.; Begum, N. A. Antioxidant Activity of Indian Propolis and Its Chemical Constituents. *Food Chemistry* **2010**, *122*, 233–237.
- (27) Mello, B. C. B. S.; Petrus, J. C. C.; Hubinger, M. D. Concentration of Flavonoids and Phenolic Compounds in Aqueous and Ethanolic Propolis Extracts through Nanofiltration. *Journal of Food Engineering* **2010**, *96*, 533–539.
- (28) Barbarić, M.; Mišković, K.; Bojić, M.; Lončar, M. B.; Smolčić-Bubalo, A.; Debeljak, Ž.; Medić-Šarić, M. Chemical Composition of the Ethanolic Propolis Extracts and Its Effect on HeLa Cells. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *135*, 772–778.
- (29) Piccinelli, A. L.; Lotti, C.; Campone, L.; Cuesta-Rubio, O.; Campo Fernandez, M.; Rastrelli, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 6484–6491.
- (30) Szliszka, E.; Zydowicz, G.; Janoszka, B.; Dobosz, C.; Kowalczyk-Ziomek, G.; Krol, W. Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis Sensitizes Prostate Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis. *International Journal of Oncology* **2011**, *38*, 941–953.
- (31) Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Esumi, H.; Kadota, S. Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Natural Products* **2010**, *73*, 623–627.
- (32) Agüero, M. B.; Gonzalez, M.; Lima, B.; Svetaz, L.; Sánchez, M.; Zacchino, S.; Feresin, G. E.; Schmeda-Hirschmann, G.; Palermo, J.; Wunderlin, D.; Tapia, A. Argentinean Propolis from *Zuccagnia Punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *58*, 194–201.
- (33) Sulaiman, G. M.; Sammarrae, K. W. A.; Ad'hiah, A. H.; Zucchetti, M.; Frapolli, R.; Bello, E.; Erba, E.; D'Incalci, M.; Bagnati, R. Chemical Characterization of Iraqi Propolis Samples and Assessing Their Antioxidant Potentials. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 2415–2421.
- (34) Park, Y. K.; Ikegaki, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1998**, *62*, 2230–2232.

- (35) Paviani, L. C.; Dariva, C.; Marcucci, M. C.; Cabral, F. A. Supercritical Carbon Dioxide Selectivity to Fractionate Phenolic Compounds from the Dry Ethanolic Extract of Propolis. *Journal of Food Process Engineering* **2010**, *33*, 15–27.
- (36) Volpi, N.; Bergonzini, G. Analysis of Flavonoids from Propolis by on-Line HPLC–electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *42*, 354–361.
- (37) Rebiai, A.; Lanez, T.; Belfar, M. L. In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity of Algerian Propolis by Spectrophotometrical and Electrochemical Assays. *International Journal of Pharmacology* **2011**, *7*, 113–118.
- (38) Popova, M.; Silici, S.; Kaftanoglu, O.; Bankova, V. Antibacterial Activity of Turkish Propolis and Its Qualitative and Quantitative Chemical Composition. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 221–228.
- (39) Warakomska, Z.; Maciejewicz, W. Microscopic Analysis of Propolis from Polish Regions. *Apidologie* **1992**, *23*, 277–283.
- (40) Popova, M.; Trusheva, B.; Antonova, D.; Cutajar, S.; Mifsud, D.; Farrugia, C.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H.; Bankova, V. The Specific Chemical Profile of Mediterranean Propolis from Malta. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1431–1435.
- (41) Gómez-Caravaca, A. M.; Gómez-Romero, M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Products Derived from Bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41*, 1220–1234.
- (42) Kalogeropoulos, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtzinou, I.; Karathanos, V. T. Chemical Composition, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Propolis Extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* **2009**, *116*, 452–461.
- (43) Sawaya, A. C.; Cunha, I. B. da S.; Marcucci, M. C. Analytical Methods Applied to Diverse Types of Brazilian Propolis. *Chemistry Central Journal* **2011**, *5*, 27.
- (44) Mohammadzadeh, S.; Shariatpanahi, M.; Hamed, M.; Ahmadvani, R.; Samadi, N.; Ostad, S. N. Chemical Composition, Oral Toxicity and Antimicrobial Activity of Iranian Propolis. *Food Chemistry* **2007**, *103*, 1097–1103.
- (45) Velazquez, C.; Navarro, M.; Acosta, A.; Angulo, A.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Robles-Zepeda, R.; Lugo, E.; Goycoolea, F. M.; Velazquez, E. F.; Astiazaran, H.; Hernandez, J. Antibacterial and Free-radical Scavenging Activities of Sonoran Propolis. *Journal of Applied Microbiology* **2007**, *103*, 1747–1756.
- (46) Midorikawa, K.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Nagaoka, T.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A. G.; Kadota, S. Liquid Chromatography–mass Spectrometry Analysis of Propolis. *Phytochemical Analysis* **2001**, *12*, 366–373.
- (47) Woisky, R. G.; Salatino, A. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *Journal of Agricultural Research* **1998**, *37*, 99–105.
- (48) Nagy, M.; Grancai, D. Colorimetric Determination of Flavanones in Propolis. *Pharmazie* **1996**, *51*, 100–101.
- (49) Folin, O.; Ciocalteu, V. On Tyrosine and Tryptophan Determination in Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1929**, *73*, 627–650.
- (50) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, 144–158.
- (51) Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins. *Food Chemistry* **2004**, *84*, 329–339.
- (52) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in Enzymology*; Lester Packer, Ed.; Oxidants and Antioxidants Part A; Academic Press, 1999; Vol. 299, pp. 152–178.
- (53) Ikawa, M.; Schaper, T. D.; Dollard, C. A.; Sasner, J. J. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 1811–1815.
- (54) Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M. J. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1370–1373.

- (55) Mammen, D.; Daniel, M. A Critical Evaluation on the Reliability of Two Aluminum Chloride Chelation Methods for Quantification of Flavonoids. *Food Chemistry* **2012**, *135*, 1365–1368.
- (56) Chang, C.-C.; Yang, M.-H.; Wen, H.-M.; Chern, J.-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **2002**, *10*, 178–182.
- (57) Marghitas, L. A.; Dezmirean, D.; Laslo, L.; Moise, A.; Popescu, O.; Maghear, O. VALIDATED METHOD FOR ESTIMATION OF TOTAL FLAVONOIDS IN ROMANIAN PROPOLIS. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies* **2009**, *64*.
- (58) Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Simova, S.; Nikolova, N.; Kujungiev, A.; Popov, S. Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **1996**, *51*, 277–280.
- (59) Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Miorin, P. L.; da Rocha Pasin, F.; Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2006**, *3*, 249–254.
- (60) Darwish, R. M.; Fares, R. J. A.; Zarga, M. H. A.; Nazer, I. K. Antibacterial Effect of Jordanian Propolis and Isolated Flavonoids against Human Pathogenic Bacteria. *African Journal of Biotechnology* **2013**, *9*, 5966–5974.
- (61) Santos, F. A.; Bastos, E. M. A.; Uzeda, M.; Carvalho, M. A. R.; Farias, L. M.; Moreira, E. S. A.; Braga, F. C. Antibacterial Activity of Brazilian Propolis and Fractions against Oral Anaerobic Bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, *80*, 1–7.
- (62) Pino, J. A.; Marbot, R.; Delgado, A.; Zumárraga, C.; Sauri, E. Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. *Journal of Essential Oil Research* **2006**, *18*, 53–56.
- (63) Pellati, F.; Orlandini, G.; Pinetti, D.; Benvenuti, S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS Methods for Metabolite Profiling of Propolis Extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55*, 934–948.
- (64) Volpi, N. Separation of Flavonoids and Phenolic Acids from Propolis by Capillary Zone Electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1872–1878.
- (65) Chi, H.; Hsieh, A. K.; Ng, C. L.; Lee, H. K.; Li, S. F. Y. Determination of Components in Propolis by Capillary Electrophoresis and Photodiode Array Detection. *Journal of Chromatography A* **1994**, *680*, 593–597.
- (66) Ferreres, F.; Blázquez, M. A.; Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A. Separation of Honey Flavonoids by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1994**, *669*, 268–274.
- (67) Sawaya, A. C. H. F.; Tomazela, D. M.; Cunha, I. B. S.; Bankova, V. S.; Marcucci, M. C.; Custodio, A. R.; Eberlin, M. N. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Propolis. *Analyst* **2004**, *129*, 739–744.
- (68) Pietta, P. G.; Gardana, C.; Pietta, A. M. Analytical Methods for Quality Control of Propolis. *Fitoterapia* **2002**, *73*, Supplement 1, S7–S20.
- (69) Petrova, A.; Popova, M.; Kuzmanova, C.; Tsvetkova, I.; Naydenski, H.; Muli, E.; Bankova, V. New Biologically Active Compounds from Kenyan Propolis. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 509–514.
- (70) Athikomkulchai, S.; Awale, S.; Ruangrunsi, N.; Ruchirawat, S.; Kadota, S. Chemical Constituents of Thai Propolis. *Fitoterapia* **2013**, *88*, 96–100.
- (71) Bertelli, D.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Marcazzan, G. L.; Plessi, M. ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochemical Analysis* **2012**, *23*, 260–266.
- (72) Bankova, V. Recent Trends and Important Developments in Propolis Research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2005**, *2*, 29–32.
- (73) Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A.-G. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z. Naturforsch* **2002**, *57c*, 530–533.
- (74) Rubiolo, P.; Casetta, C.; Cagliero, C.; Brevard, H.; Sgorbini, B.; Bicchi, C. Populus Nigra L. Bud Absolute: A Case Study for a Strategy of Analysis of Natural Complex Substances. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 1223–1235.

- (75) Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2003**, *51*, 740–742.
- (76) Teixeira, E. W.; Negri, G.; Meira, R. M. S. A.; Message, D.; Salatino, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2005**, *2*, 85–92.
- (77) Salatino, A.; Teixeira, E. W.; Negri, G.; Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2005**, *2*, 33–38.
- (78) Mishima, S.; Inoh, Y.; Narita, Y.; Ohta, S.; Sakamoto, T.; Araki, Y.; Suzuki, K.-M.; Akao, Y.; Nozawa, Y. Identification of Caffeoylquinic Acid Derivatives from Brazilian Propolis as Constituents Involved in Induction of Granulocytic Differentiation of HL-60 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 5814–5818.
- (79) Tomás-Barberán, F. A.; García-Viguera, C.; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. Phytochemical Evidence for the Botanical Origin of Tropical Propolis from Venezuela. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 191–196.
- (80) Hernández, I. M.; Fernandez, M. C.; Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Polyprenylated Benzophenone Derivatives from Cuban Propolis. *Journal of Natural Products* **2005**, *68*, 931–934.
- (81) De Castro Ishida, V. F.; Negri, G.; Salatino, A.; Bandeira, M. F. C. L. A New Type of Brazilian Propolis: Prenylated Benzophenones in Propolis from Amazon and Effects against Cariogenic Bacteria. *Food Chemistry* **2011**, *125*, 966–972.
- (82) Castro, M. L.; Nascimento, A. M. do; Ikegaki, M.; Costa-Neto, C. M.; Alencar, S. M.; Rosalen, P. L. Identification of a Bioactive Compound Isolated from Brazilian Propolis Type 6. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 5332–5335.
- (83) Cuesta-Rubio, O.; Frontana-Uribe, B. A.; Ramírez-Apan, T.; Cárdenas, J. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **2002**, *57*, 372–378.
- (84) De Oliveira, C. M. A.; Porto, A.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A. J. Floral Resins of *Clusia* Spp.: Chemical Composition and Biological Function. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6427–6430.
- (85) Huang, W.-J.; Huang, C.-H.; Wu, C.-L.; Lin, J.-K.; Chen, Y.-W.; Lin, C.-L.; Chuang, S.-E.; Huang, C.-Y.; Chen, C.-N. Propolin G, a Prenylflavanone, Isolated from Taiwanese Propolis, Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Brain Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 7366–7376.
- (86) Kumazawa, S.; Goto, H.; Hamasaka, T.; Fukumoto, S.; Fujimoto, T.; Nakayama, T. A New Prenylated Flavonoid from Propolis Collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2004**, *68*, 260–262.
- (87) Kumazawa, S.; Nakamura, J.; Murase, M.; Miyagawa, M.; Ahn, M.-R.; Fukumoto, S. Plant Origin of Okinawan Propolis: Honeybee Behavior Observation and Phytochemical Analysis. *Die Naturwissenschaften* **2008**, *95*, 781–786.
- (88) El-Bassuony, A. A. New prenilated compound from Egyptian propolis with antimicrobial activity. *Revista Latinoamericana de Quimica* **2009**, *37*, 85–90.
- (89) Matsubayashi, H.; Lagan, P.; Sukor, J. R. A. Utilization of Macaranga Trees by the Asian Elephants (*Elephas Maximus*) in Borneo. *Mammal Study* **2006**, *31*, 115–118.
- (90) Silici, S.; Kutluca, S. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Propolis Collected by Three Different Races of Honeybees in the Same Region. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *99*, 69–73.
- (91) Popova, M. P.; Graikou, K.; Chinou, I.; Bankova, V. S. GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 3167–3176.
- (92) Meagher, L. P.; Beecher, G. R. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **2000**, *13*, 935–947.

- (93) Dausch, A.; Moraes, C. S.; Fort, P.; Park, Y. K. Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2008**, *5*, 435–441.
- (94) López, B. G.-C.; Schmidt, E. M.; Eberlin, M. N.; Sawaya, A. C. H. F. Phytochemical Markers of Different Types of Red Propolis. *Food Chemistry* **2014**, *146*, 174–180.
- (95) Valcic, S.; Montenegro, G.; Timmermann, B. N. Lignans from Chilean Propolis. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 771–775.
- (96) Meneses, E. A.; Durango, D. L.; García, C. M. Antifungal Activity against Postharvest Fungi by Extracts from Colombian Propolis. *Química Nova* **2009**, *32*, 2011–2017.
- (97) Popova, M.; Bankova, V.; Spassov, S.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Silva, M. V.; Tsartsarova, M. New Bioactive Chalcones in Propolis from El Salvador. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **2001**, *56*, 593–596.
- (98) Christov, R.; Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Bertrand, M. Chemical Composition of Propolis from Canada, Its Antiradical Activity and Plant Origin. *Natural Product Research* **2006**, *20*, 531–536.
- (99) Johnson, K. S.; Eischen, F. A.; Giannasi, D. E. Chemical Composition of North American Bee Propolis and Biological Activity towards Larvae of Greater Wax Moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Chemical Ecology* **1994**, *20*, 1783–1791.
- (100) Bankova, V. S.; Christov, R.; Tejera, A. D. Lignans and Other Constituents of Propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1411–1415.
- (101) Velikova, M.; Bankova, V.; Sorkun, K.; Houcine, S.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Propolis from the Mediterranean Region: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Zeitschrift für Naturforschung* **2000**, *55c*, 790–793.
- (102) Popova, M.; Trusheva, B.; Cutajar, S.; Antonova, D.; Mifsud, D.; Farrugia, C.; Bankova, V. Identification of the Plant Origin of the Botanical Biomarkers of Mediterranean Type Propolis. *Natural Product Communications* **2012**, *7*, 569–570.
- (103) Banskota, A. H.; Nagaoka, T.; Sumioka, L. Y.; Tezuka, Y.; Awale, S.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Antiproliferative Activity of the Netherlands Propolis and Its Active Principles in Cancer Cell Lines. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, *80*, 67–73.
- (104) Shaheen, S. A.; Zarga, M. H. A.; Nazer, I. K.; Darwish, R. M.; Al-Jaber, H. I. Chemical Constituents of Jordanian Propolis. *Natural Product Research* **2011**, *25*, 1312–1318.
- (105) Popova, M.; Dimitrova, R.; Al-Lawati, H. T.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H.; Bankova, V. Omani Propolis: Chemical Profiling, Antibacterial Activity and New Propolis Plant Sources. *Chemistry Central Journal* **2013**, *7*, 158.
- (106) Awale, S.; Shrestha, S. P.; Tezuka, Y.; Ueda, J.; Matsushige, K.; Kadota, S. Neoflavonoids and Related Constituents from Nepalese Propolis and Their Nitric Oxide Production Inhibitory Activity. *Journal of Natural Products* **2005**, *68*, 858–864.
- (107) Shrestha, S. P.; Narukawa, Y.; Takeda, T. Chemical Constituents of Nepalese Propolis II. *Chemical and pharmaceutical Bulletin* **2007**, *55*, 926–929.
- (108) Shrestha, S. P.; Narukawa, Y.; Takeda, T. Chemical Constituents of Nepalese Propolis (II). *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2007**, *55*, 926–929.
- (109) Li, F.; Awale, S.; Zhang, H.; Tezuka, Y.; Esumi, H.; Kadota, S. Chemical Constituents of Propolis from Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against a Human Pancreatic Cancer Cell Line. *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 1283–1287.
- (110) Trusheva, B.; Popova, M.; Koendhori, E. B.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Bankova, V. Indonesian Propolis: Chemical Composition, Biological Activity and Botanical Origin. *Natural Product Research* **2011**, *25*, 606–613.
- (111) Usia, T.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Constituents of Chinese Propolis and Their Antiproliferative Activities. *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 673–676.
- (112) Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Bang, K.-S.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 7286–7292.

- (113) Kumazawa, S.; Suzuki, S.; Ahn, M. R.; Kamihira, M.; Udagawa, Y.; Bang, K. S.; Nakayama, T. A New Chalcone from Propolis Collected on Jeju Island, Korea. *Food Science and Technology Research* **2006**, *12*, 67–69.
- (114) Hamasaka, T.; Kumazawa, S.; Fujimoto, T. F.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan. *Food Science and Technology Research* **10**, 86–92.
- (115) Kumazawa, S.; Fukumoto, S. Macaranga Tanarius, the Plant Origin of Okinawan Propolis. *Mitsubachi Kagaku* **2010**, *28*, 1–6.
- (116) Popravko, S. A.; Sokolov, M. V. Plant sources of propolis. *Pchelovodstvo* **1980**, 28–29.
- (117) Missima, F.; Filho, A. A. da S.; Nunes, G. A.; Bueno, P. C. P.; De Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; Sforcin, J. M. Effect of Baccharis Dracunculifolia D.C (Asteraceae) Extracts and Its Isolated Compounds on Macrophage Activation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2007**, *59*, 463–468.
- (118) Tazawa, S.; Warashina, T.; Noro, T. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis II. *Chemical and pharmaceutical Bulletin* **1999**, *47*, 1388–1392.
- (119) Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 896–900.
- (120) Trusheva, B.; Popova, M.; Naydenski, H.; Tsvetkova, I.; Rodriguez, J. G.; Bankova, V. New Polyisoprenylated Benzophenones from Venezuelan Propolis. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 683–689.
- (121) Awale, S.; Li, F.; Onozuka, H.; Esumi, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Constituents of Brazilian Red Propolis and Their Preferential Cytotoxic Activity against Human Pancreatic PANC-1 Cancer Cell Line in Nutrient-Deprived Condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 181–189.
- (122) Bankova, V. Chemical Diversity of Propolis and the Problem of Standardization. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *100*, 114–117.
- (123) Popova, M. P.; Bankova, V. S.; Bogdanov, S.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Marcuzzan, G. L.; Sabatini, A.-G. Chemical Characteristics of Poplar Type Propolis of Different Geographic Origin. *Apidologie* **2007**, *38*, 306–311.
- (124) Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* **2009**, *4*, 25–39.
- (125) Gregoris, E.; Stevanato, R. Correlations between Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Venetian Propolis. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 76–82.
- (126) Rodríguez, Y.; Sánchez-Catalán, F.; Rojano, B.; Durango, D.; Gil, J.; Marín-Loaiza, J. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del atlántico, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* **2012**, *15*, 303–311.
- (127) Silva, V.; Genta, G.; Möller, M. N.; Masner, M.; Thomson, L.; Romero, N.; Radi, R.; Fernandes, D. C.; Laurindo, F. R. M.; Heinzen, H.; Fierro, W.; Denicola, A. Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 6430–6437.
- (128) Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. Antioxidant Activity of Propolis: Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Galangin. *Fitoterapia* **2002**, *73*, Supplement 1, S21–S29.
- (129) Özcan, M. Inhibition of Aspergillus Parasiticus NRRL 2999 by Pollen and Propolis Extracts. *Journal of Medicinal Food* **2004**, *7*, 114–116.
- (130) Netíková, L.; Bogusch, P.; Heneberg, P. Czech Ethanol-Free Propolis Extract Displays Inhibitory Activity against a Broad Spectrum of Bacterial and Fungal Pathogens. *Journal of Food Science* **2013**, *78*, M1421–M1429.
- (131) Siqueira, A. b. s.; Gomes, B. s.; Cambuim, I.; Maia, R.; Abreu, S.; Souza-Motta, C. m.; De Queiroz, L. a.; Porto, A. I. f. Trichophyton Species Susceptibility to Green and Red Propolis from Brazil. *Letters in Applied Microbiology* **2009**, *48*, 90–96.
- (132) Koç, N. A.; Silici, S. Comparative Study Ofin Vitro Methods Used to Analyse the Antifungal Activity of Propolis against Trichophyton Rubrum and Trichophyton Mentagrophytes. *Annals of Microbiology* **2008**, *58*, 543–547.

- (133) Murad, J. M.; Calvi, S. A.; Soares, A. M. V. C.; Bankova, V.; Sforcin, J. M. Effects of Propolis from Brazil and Bulgaria on Fungicidal Activity of Macrophages against *Paracoccidioides Brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, *79*, 331–334.
- (134) Lu, L.-C.; Chen, Y.-W.; Chou, C.-C. Antibacterial Activity of Propolis against *Staphylococcus Aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **2005**, *102*, 213–220.
- (135) Koo, H.; Gomes, B. P. F. A.; Rosalen, P. L.; Ambrosano, G. M. B.; Park, Y. K.; Cury, J. A. In Vitro Antimicrobial Activity of Propolis and Arnica Montana against Oral Pathogens. *Archives of Oral Biology* **2000**, *45*, 141–148.
- (136) Joëlle Millet; Marie-Claude Martini; Monique Seiller. Chapitre 18 : Matières premières produites par l'abeille. 2- La propolis. In *Actifs et additifs en cosmétologie (3^e Éd.)*; Lavoisier, 2006; pp. 338–350.
- (137) Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Dantas, A. P.; Valente, P. H. M.; Paulino, N. Phenolic Compounds from Brazilian Propolis with Pharmacological Activities. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, *74*, 105–112.
- (138) Yang, H.-Y.; Chang, C.-M.; Chen, Y.-W.; Chou, C.-C. Inhibitory Effect of Propolis Extract on the Growth of *Listeria Monocytogenes* and the Mutagenicity of 4-Nitroquinoline-N-Oxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, *86*, 937–943.
- (139) Boyanova, L.; Gergova, G.; Nikolov, R.; Derejian, S.; Lazarova, E.; Katsarov, N.; Mitov, I.; Krastev, Z. Activity of Bulgarian Propolis against 94 *Helicobacter Pylori* Strains in Vitro by Agar-Well Diffusion, Agar Dilution and Disc Diffusion Methods. *Journal of medical microbiology* **2005**, *54*, 481–483.
- (140) Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana, I. K.; Ishii, E.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Hepatoprotective and Anti-*Helicobacter Pylori* Activities of Constituents from Brazilian Propolis. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 16–23.
- (141) Santos, V. R.; Gomes, R. T.; Mesquita, R. A. de; Moura, M. D. G. de; França, E. C.; Aguiar, E. G. de; Naves, M. D.; Abreu, J. A. S.; Abreu, S. R. L. Efficacy of Brazilian Propolis Gel for the Management of Denture Stomatitis: A Pilot Study. *Phytotherapy Research* **2008**, *22*, 1544–1547.
- (142) Sforcin, J. M.; Bankova, V. Propolis: Is There a Potential for the Development of New Drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *133*, 253–260.
- (143) Fernandes Júnior, A.; Balestrin, E. C.; Betoni, J. E. C.; Orsi, R. de O.; Cunha, M. de L. R. de S. da; Montelli, A. C. Propolis: Anti-*Staphylococcus Aureus* Activity and Synergism with Antimicrobial Drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 563–566.
- (144) Stepanović, S.; Antić, N.; Dakić, I.; Švabić-Vlahović, M. In Vitro Antimicrobial Activity of Propolis and Synergism between Propolis and Antimicrobial Drugs. *Microbiological Research* **2003**, *158*, 353–357.
- (145) Schnitzler, P.; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack, H.; Sensch, K. H.; Reichling, J. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research* **2010**, *24*, S20–S28.
- (146) Liu, A.-L.; Wang, H.-D.; Lee, S. M.; Wang, Y.-T.; Du, G.-H. Structure–activity Relationship of Flavonoids as Influenza Virus Neuraminidase Inhibitors and Their in Vitro Anti-Viral Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 7141–7147.
- (147) Burke, T. R. J.; Fesen, M.; Mazumder, A.; Yung, J.; Wang, J.; Carothers, A. M.; Grunberger, D.; Driscoll, J.; Pommier, Y.; Kohn, K. Hydroxylated Aromatic Inhibitors of HIV-1 Integrase. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 4171–4178.
- (148) Gekker, G.; Hu, S.; Spivak, M.; Lokensgard, J. R.; Peterson, P. K. Anti-HIV-1 Activity of Propolis in CD4+ Lymphocyte and Microglial Cell Cultures. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *102*, 158–163.
- (149) Rossi, A.; Ligresti, A.; Longo, R.; Russo, A.; Borrelli, F.; Sautebin, L. The Inhibitory Effect of Propolis and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cyclooxygenase Activity in J774 Macrophages. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 530–535.
- (150) Orsatti, C. L.; Missima, F.; Pagliarone, A. C.; Sforcin, J. M. Th1/Th2 Cytokines' Expression and Production by Propolis-Treated Mice. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *129*, 314–318.

- (151) Park, J. H.; Lee, J. K.; Kim, H. S.; Chung, S. T.; Eom, J. H.; Kim, K. A.; Chung, S. J.; Paik, S. Y.; Oh, H. Y. Immunomodulatory Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Balb/c Mice. *International Immunopharmacology* **2004**, *4*, 429–436.
- (152) Orsi, R. O.; Funari, S. R. C.; Soares, A. M. V. C.; Calvi, S. A.; Oliveira, S. L.; Sforcin, J. M.; Bankova, V. Immunomodulatory Action of Propolis on Macrophage Activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins* **2000**, *6*, 205–219.
- (153) Sforcin, J. M. Propolis and the Immune System: A Review. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *113*, 1–14.
- (154) Chirumbolo, S. Propolis as Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Compounds: Which Role for Flavonoids? *International Immunopharmacology* **2011**, *11*, 1386–1387.
- (155) Khayyal, M. T.; El-Ghazaly, M. A.; El-Khatib, A. S.; Hatem, A. M.; De Vries, P. J. F.; El-Shafei, S.; Khattab, M. M. A Clinical Pharmacological Study of the Potential Beneficial Effects of a Propolis Food Product as an Adjuvant in Asthmatic Patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2003**, *17*, 93–102.
- (156) Sawicka, D.; Car, H.; Borawska, M. H.; Nikliński, J. The Anticancer Activity of Propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **2012**, *50*, 25–37.
- (157) Watanabe, M. A. E.; Amarante, M. K.; Conti, B. J.; Sforcin, J. M. Cytotoxic Constituents of Propolis Inducing Anticancer Effects: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *63*, 1378–1386.
- (158) Valente, M. J.; Baltazar, A. F.; Henrique, R.; Estevinho, L.; Carvalho, M. Biological Activities of Portuguese Propolis: Protection against Free Radical-Induced Erythrocyte Damage and Inhibition of Human Renal Cancer Cell Growth in Vitro. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 86–92.
- (159) Sha, N.; Guan, S.-H.; Lu, Z.-Q.; Chen, G.-T.; Huang, H.-L.; Xie, F.-B.; Yue, Q.-X.; Liu, X.; Guo, D.-A. Cytotoxic Constituents of Chinese Propolis. *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 799–801.
- (160) Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Cytotoxic Constituents from Brazilian Red Propolis and Their Structure–activity Relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 5434–5440.
- (161) Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Melliou, E.; Chinou, I. Antiproliferative Activity of Greek Propolis. *Journal of Medicinal Food* **2010**, *13*, 286–290.
- (162) Najafi, M. F.; Vahedy, F.; Seyyedini, M.; Jomehzadeh, H. R.; Bozary, K. Effect of the Water Extracts of Propolis on Stimulation and Inhibition of Different Cells. *Cytotechnology* **2007**, *54*, 49–56.
- (163) Hernandez, J.; Goycoolea, F.; Quintero, J.; Acosta, A.; Castañeda, M.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Vazquez-Moreno, L.; Velazquez, E.; Astiazaran, H.; Lugo, E.; Velazquez, C. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica* **2007**, *73*, 1469–1474.
- (164) Lee, K. W.; Kang, N. J.; Kim, J. H.; Lee, K. M.; Lee, D. E.; Hur, H. J.; Lee, H. J. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Invasion and Expression of Matrix Metalloproteinase in SK-Hep1 Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting Nuclear Factor Kappa B. *Genes & Nutrition* **2008**, *2*, 319–322.
- (165) Lee, K. J.; Choi, J. H.; Hwang, Y. P.; Chung, Y. C.; Jeong, H. G. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Hepatotoxicity and DNA Damage. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 2445–2450.
- (166) Jin, U.-H.; Song, K.-H.; Motomura, M.; Suzuki, I.; Gu, Y.-H.; Kang, Y.-J.; Moon, T.-C.; Kim, C.-H. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Myeloid Leukemia U937 Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2008**, *310*, 43–48.
- (167) Jung, B.; Kim, M.; Kim, H.-A.; Kim, D.; Yang, J.; Her, S.; Song, Y. S. Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Component of Beehive Propolis, Is a Novel Selective Estrogen Receptor Modulator. *Phytotherapy Research* **2010**, *24*, 295–300.
- (168) Lin, W.-L.; Liang, W.-H.; Lee, Y.-J.; Chuang, S.-K.; Tseng, T.-H. Antitumor Progression Potential of Caffeic Acid Phenethyl Ester Involving p75NTR in C6 Glioma Cells. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *188*, 607–615.

- (169) Lin, H.-P.; Lin, C.-Y.; Liu, C.-C.; Su, L.-C.; Huo, C.; Kuo, Y.-Y.; Tseng, J.-C.; Hsu, J.-M.; Chen, C.-K.; Chuu, C.-P. Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Potential Treatment for Advanced Prostate Cancer Targeting Akt Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*, 5264–5283.
- (170) Oztürk, F.; Kurt, E.; Inan, U. U.; Emiroğlu, L.; Ilker, S. S. The Effects of Acetylcholine and Propolis Extract on Corneal Epithelial Wound Healing in Rats. *Cornea* **1999**, *18*, 466–471.
- (171) De Barros, M. P.; Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; de Andrade, S. F. Effect of Brazilian Green Propolis on Experimental Gastric Ulcers in Rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *110*, 567–571.
- (172) Lemos, M.; De Barros, M. P.; Sousa, J. P. B.; Filho, A. A. da S.; Bastos, J. K.; De Andrade, S. F. Baccharis Dracunculifolia, the Main Botanical Source of Brazilian Green Propolis, Displays Antiulcer Activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2007**, *59*, 603–608.
- (173) Pontin, K.; Filho, A. A. D. S.; Santos, F. F.; Silva, M. L. A. e; Cunha, W. R.; Nanayakkara, N. P. D.; Bastos, J. K.; Albuquerque, S. de. In Vitro and in Vivo Antileishmanial Activities of a Brazilian Green Propolis Extract. *Parasitology Research* **2008**, *103*, 487–492.
- (174) Jasprica, I.; Mornar, A.; Debeljak, Ž.; Smolčić-Bubalo, A.; Medić-Šarić, M.; Mayer, L.; Romić, Ž.; Bućan, K.; Balog, T.; Sobočanec, S.; Šverko, V. In Vivo Study of Propolis Supplementation Effects on Antioxidative Status and Red Blood Cells. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *110*, 548–554.
- (175) Burdock, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* **1998**, *36*, 347–363.
- (176) Gardana, C.; Simonetti, P. Evaluation of Allergens in Propolis by Ultra-Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25*, 1675–1682.

Chapitre II :

Caractérisation chimique

Chapitre II : Caractérisation chimique

1. Echantillon de propolis

Comme mentionné précédemment, la composition de la propolis est très variable. Elle dépend notamment de la flore environnante et du climat, donc de la zone de collecte. C'est pourquoi, afin d'en faciliter la caractérisation chimique et de s'affranchir des variabilités inter-échantillons nous avons décidé, dans un premier temps, de travailler selon une technique de "pooling" sur un mélange de plusieurs lots, afin de créer un échantillon moyen, représentatif de la propolis produite par la société Ballot-Flurin Apiculteurs (BFA), aujourd'hui Abeilles Santé.

1.1. Matière première

L'échantillon de propolis utilisé pour cette étude est donc un mélange de propolis brutes (200 g) fourni par l'entreprise BFA en novembre 2011. Ce mélange est constitué de 24 lots différents, provenant de 15 départements français (figure II-1), récoltés sur 2 années (2010 et 11), et correspondant à l'état des stocks de l'entreprise en propolis brute à ce moment précis.



Figure II-1. Sites de collectes des lots de propolis (points noirs), localisation de l'entreprise BFA (point rouge)

Macroscopiquement, ce mélange apparaissait très hétérogène puisque l'on y observait différentes colorations (marron, rouge, noire, beige-verte) et textures (friable, cassable, molle, dure) (Figure II-2).



Figure II-2. Mélange de propolis (a) comprenant de la propolis marron (b), rouge (c), noire (d) et beige-verte (e)

1.2. Préparation

1.2.1. Triage des impuretés

La première étape, après réception de la propolis brute, a donc été de la répartir sur une surface propre, de retirer les impuretés visibles telles que les tiges de bois, ailes et corps d'abeille, petits vers blancs secs, etc. (Figure II-3).



Figure II-3. Impuretés présentes dans les 200 g de propolis reçus

1.2.2. Cryobroyage

La seconde étape a consisté à broyer cette propolis triée dans un mortier après immersion dans de l'azote liquide (le froid évitant à la propolis de s'agglomérer et de coller au pilon) jusqu'à obtention d'une poudre grossière (Figure II-4).

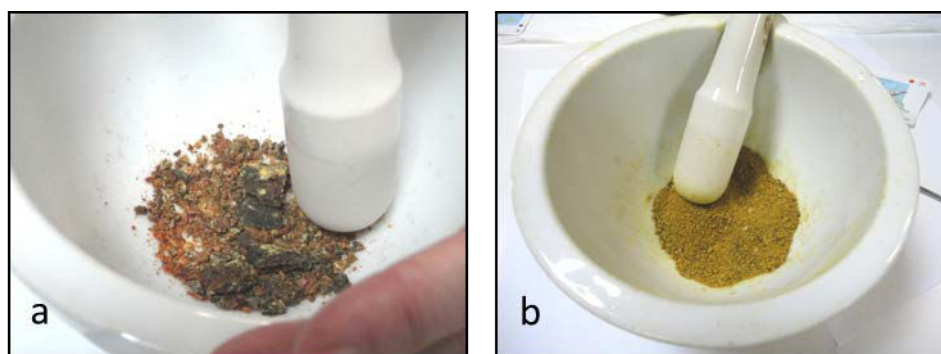


Figure II-4. Avant (a) et après (b) cryobroyage

La propolis broyée est alors conditionnée dans des flacons ambrés et stockée au congélateur à -18°C.

2. Extractions

Plusieurs extractions utilisant différents solvants ont été réalisées sur ce mélange de propolis afin de comparer les rendements, profils chromatographiques et -par la suite- activités biologiques. Ces essais préliminaires avaient pour but de déterminer les meilleures conditions pour l'extraction "pilote" servant de support à cette étude.

2.1. Macérations alcooliques simples

Après étude bibliographique, les deux premiers choix de solvant se sont portés sur l'éthanol 70% (E01) et sur le méthanol (E02). Dans le premier cas il s'agissait de réaliser une teinture-mère, une solution hydro-alcoolique à 70% permettant l'extraction concomitante des composés solubles dans l'alcool et dans l'eau^{12,23,38,40}. Dans le second cas, la composition chimique et les activités biologiques de plusieurs propolis mexicaines ayant été déterminées à partir d'extraits méthanoliques, une comparaison directe pouvait être envisagée^{31,45}. Parallèlement, deux modes d'agitation furent également évalués : l'agitation magnétique continue d'une part ou par ultrasons d'autre part. Le tableau II-1 montre les rendements d'extraction obtenus selon les deux modes d'agitation. Ils sont assez similaires pour les deux systèmes de solvants.

Tableau II-1. Rendement d'extraction par EtOH 70% et MeOH selon deux modes d'agitation : agitation magnétique (AM) (5% de propolis, 3x24h) ou ultrasons (US) (5% de propolis, 3x2h)

Extraits	Rendement (%)	
	Agitation magnétique (AM)	Ultrasons (US)
EtOH 70% (E01)	64.6	67.3
MeOH (E02)	66.4	67.6

L'agitation par ultrason présentait l'inconvénient d'une rapide (quelques minutes) élévation de la température de l'extrait. Cette technique a donc été abandonnée au profit de l'agitation magnétique continue, qui dans un souci d'application ultérieure au sein de l'entreprise, ne nécessitait pas l'ajout d'un dispositif de refroidissement. Dans la même optique, le temps d'extraction de 3x24h fut réduit à 3x2h dans un nouvel essai, sans grande modification du rendement extractif, puisque la dissolution de la propolis dans l'alcool apparaissait relativement rapide (le solvant semblant saturer rapidement). Le rendement d'extraction, jusqu'à épuisement de la matière, a été calculé et est donné dans le tableau II-2.

Tableau II-2. Rendements (en %) de chaque extraction par l'EtOH 70% (3x2h)

Extraction EtOH 70%	Rendement (%)	% relatif
1 ^{ère} étape	61.2	94.4
2 ^{ème} étape	3.4	5.2
3 ^{ème} étape	0.2	0.3
Total	64.8	100

Ainsi, on remarque que l'extraction est accomplie à près de 95% dès la première étape. La seconde étape apporte 5% complémentaires tandis que l'échantillon est finalement épuisé (+ 0.3%) lors de la troisième étape.

Un troisième type d'extrait alcoolique était fréquemment rencontré dans les publications, il s'agissait de l'extrait éthanolique de propolis (EEP) réalisé avec de l'éthanol dit "classique" c'est-à-dire de l'éthanol 95-96% (E04)^{30,36,39}. Le rendement obtenu pour notre propolis était alors de 68.5 % (conditions : 5% de propolis, 3x2h).

2.2. Extractions successives

Nous avons dans un second temps procédé à des extractions multiples successives²² avec des solvants de polarité croissante : cyclohexane, dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (AcOEt) et MeOH (E04) conduisant à des rendements respectifs de 31.4, 50.1, 12.9 et 3.3 %. Le cyclohexane a permis d'extraire les composés les moins polaires : notamment cires et acides gras. La majorité des constituants (50.1%) se trouvait alors dans l'extrait par le DCM.

Un protocole d'extraction proche de celui réalisé au sein de l'entreprise au début de l'étude fut aussi utilisé (E05). Celui-ci consistait en une extraction aqueuse à chaud suivie d'une extraction par l'éthanol 90%. Le rendement en extrait aqueux était faible, de l'ordre de 6%.

Une extraction aqueuse à chaud suivie d'une extraction par le DCM ont ensuite été réalisées (E06). Cet extrait étant pâteux et semblant contenir encore beaucoup de cire, un autre essai (E07) a

ensuite consisté en une extraction préalable par le cyclohexane de façon à éliminer le maximum de cire, puis une extraction aqueuse à chaud et enfin l'extraction par le dichlorométhane. Cette fois-ci, l'extrait DCM semblait beaucoup moins cireux.

Enfin, un dernier solvant d'extraction a été testé, après une pré-extraction par le cyclohexane, il s'agissait d'un mélange triphasique considéré comme "universel" (*i.e.* ambitionnant une extraction exhaustive) DCM/MeOH/H₂O (mixte : E08), monophasique dans les proportions 31/19/4.

2.3. Comparaison des rendements d'extraction

Les rendements d'extraction des différents essais sont reportés sur la figure II-5.

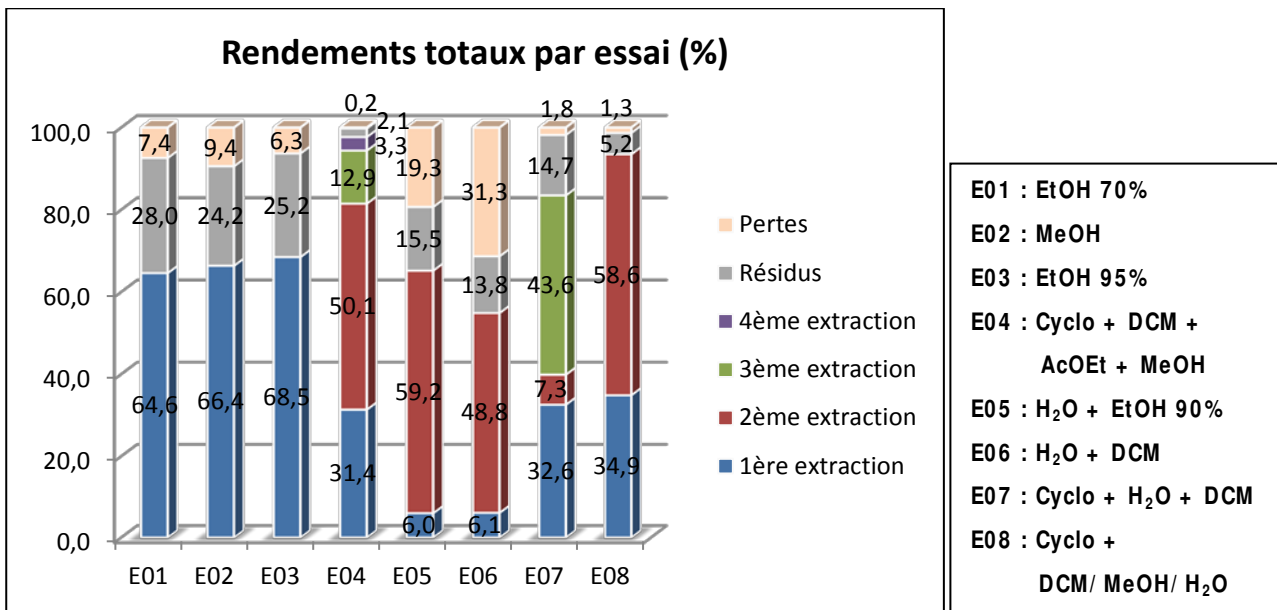


Figure II-5. Rendements des différentes extractions

Pour les macérations alcooliques simples, les rendements d'extraction sont compris entre 62 et 69%. Les meilleurs rendements d'extraction cumulés sont obtenus lorsqu'on réalise une première extraction par le cyclohexane (en moyenne : 33.0 ± 1.8 %), à savoir respectivement 97.7 % pour E04, 83.5 % pour E07 et 93.5 % pour E08. Ces rendements cumulés sont un peu plus faibles lorsque la première extraction est aqueuse (65.2 % pour E05 et 54.9 % pour E06) avec des taux de pertes plus importants (incluant la pellicule de cire).

3. Profils chromatographiques

Chaque extrait réalisé a été analysé en chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (HPLC/DAD). Dans un premier temps, nous comparerons simplement les profils chromatographiques des différents extraits obtenus avant de nous intéresser plus en détail aux profils UV lors des identifications structurales.

3.1. Extraits alcooliques

Les profils chromatographiques des trois premiers essais d'extractions (E01-E03) sont regroupés sur la figure II-6.

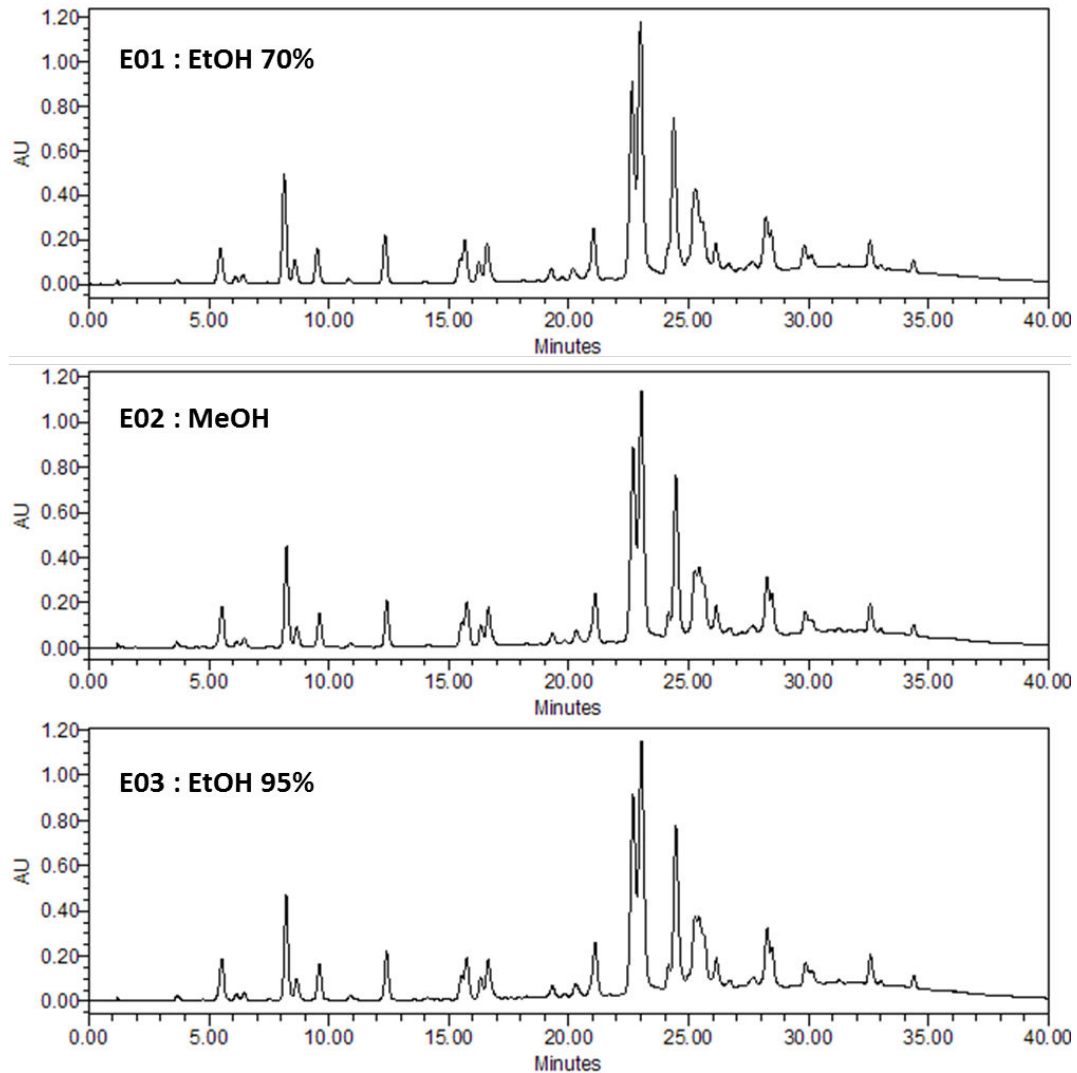


Figure II-6. Profils chromatographiques des extraits alcooliques E01, E02 et E03 (λ 280 nm, méthode 1, cf. partie expérimentale section 7.4.2)

Ces trois profils sont très proches tant au niveau des pics observés (temps de rétention) que de leurs intensités (absorbances). En termes qualitatifs, il n'existe a priori pas de différence notable entre les trois alcools utilisés, l'éthanol 70 ou 95% et le méthanol.

3.2. Extraits multiples

3.2.1. Avec solvants de polarité croissante (E04)

Les profils chromatographiques des extraits successifs sont représentés sur la figure II-7.

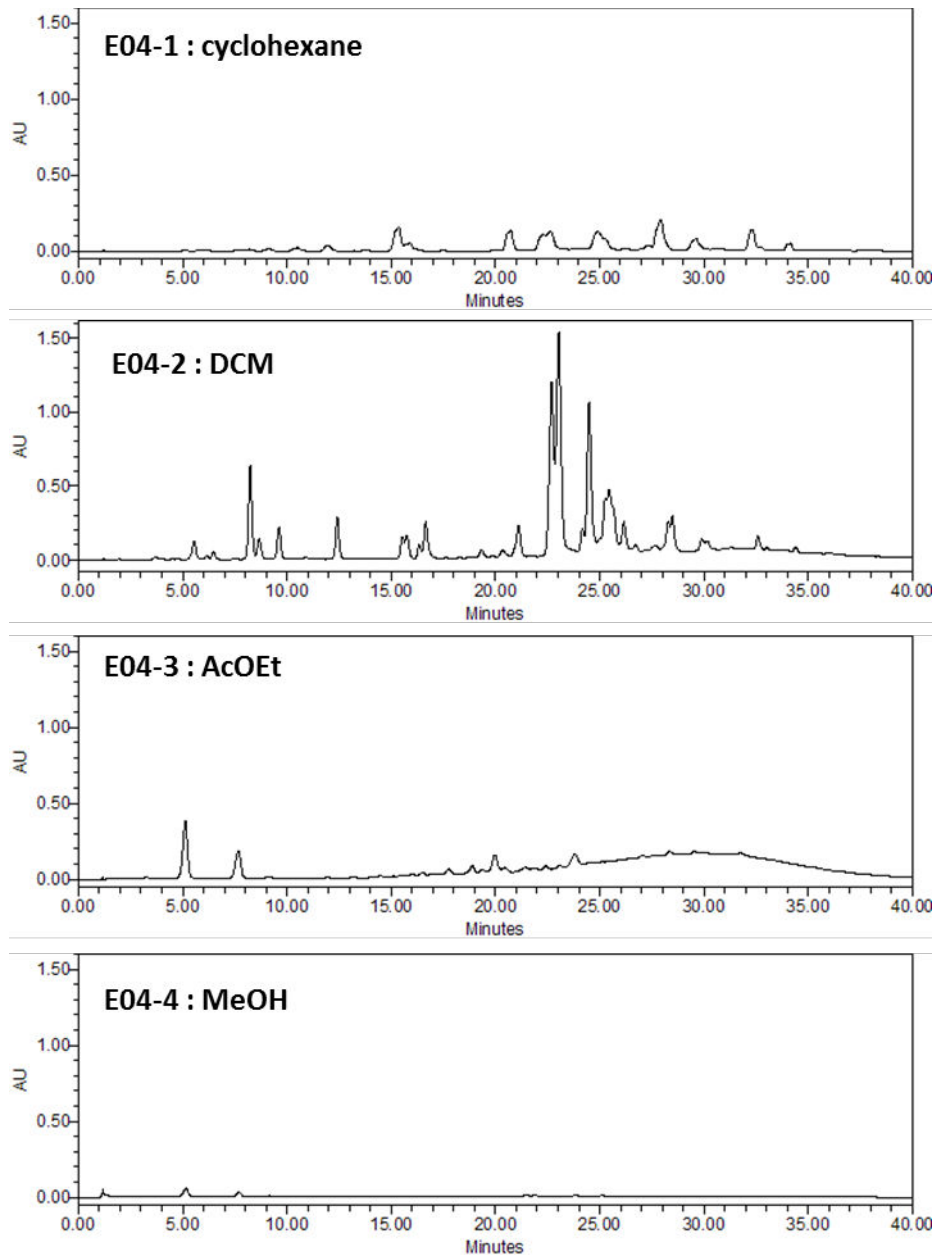


Figure II-7. Profils chromatographiques, présentés à la même échelle, des extraits E04-1 à 4 (λ 280 nm, méthode 1)

Ici l'extrait cyclohexanique contient en très faibles quantités des composés absorbants dans l'UV. En effet, une très grande proportion de cires, insolubles dans le MeOH, a été éliminée, par centrifugation, lors de la phase de préparation de l'échantillon à analyser. L'extrait DCM, quant à lui, présente un profil similaire à ceux des extraits alcooliques E01-03, avec une absorbance maximum un peu plus marquée (AU 1.5 vs 1.2). En ce qui concerne les extraits AcOEt et MeOH, peu de pics sont observés.

3.2.2. Extraits type Ballot-Flurin (E05)

Les profils chromatographiques des extraits aqueux et alcoolique obtenus selon un protocole proche de celui utilisé par l'entreprise BFA sont représentés sur la figure II-8.

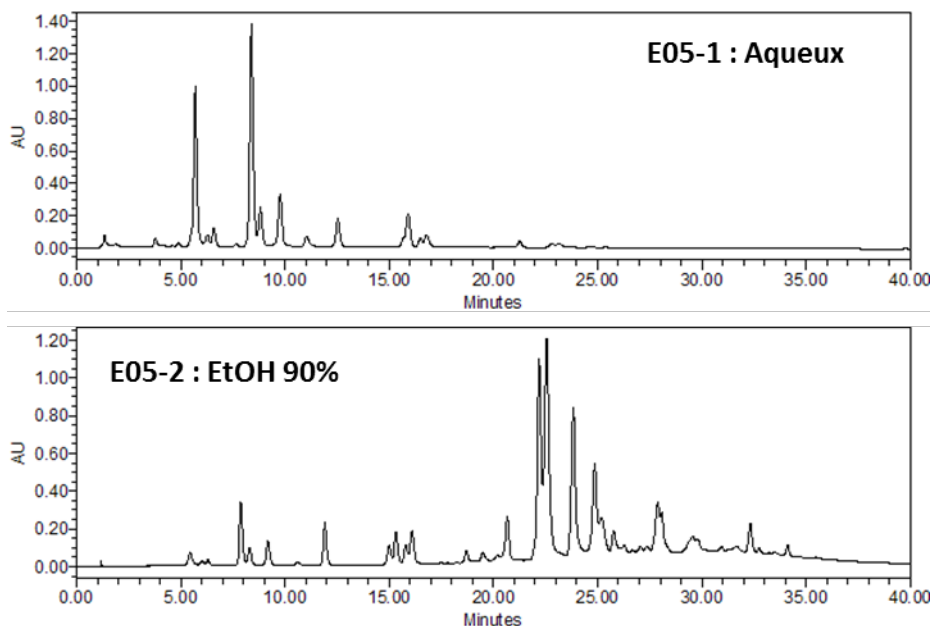


Figure II-8. Profils chromatographiques des extraits E05-1 et 2 (λ 280 nm, méthode 1)

Contrairement aux profils chromatographiques semblables des extraits E01-03 et E04-2, celui de l'extrait aqueux E05-1 est différent, il ne contient que les composés les plus polaires qui apparaissent dans la première partie du chromatogramme. L'extrait E05-2, malgré une première extraction aqueuse, contient encore ces composés les plus polaires mais en quantités moindres, son profil est similaire aux extraits E01-03 et E04-2.

3.2.3. Extraits DCM E06-2 et E07-3 et mixte : DCM/ MeOH/ H₂O (E08-2)

Les profils chromatographiques des extraits DCM, soit précédés d'une extraction aqueuse seule (dans le cas de E06-2), soit précédés d'une extraction cyclohexanique puis aqueuse (dans le cas de E07-3) ainsi que celui de l'extrait réalisé avec le solvant mixte DCM/MeOH/H₂O (31/19/4; v/v/v) sont regroupés sur la figure II-9.

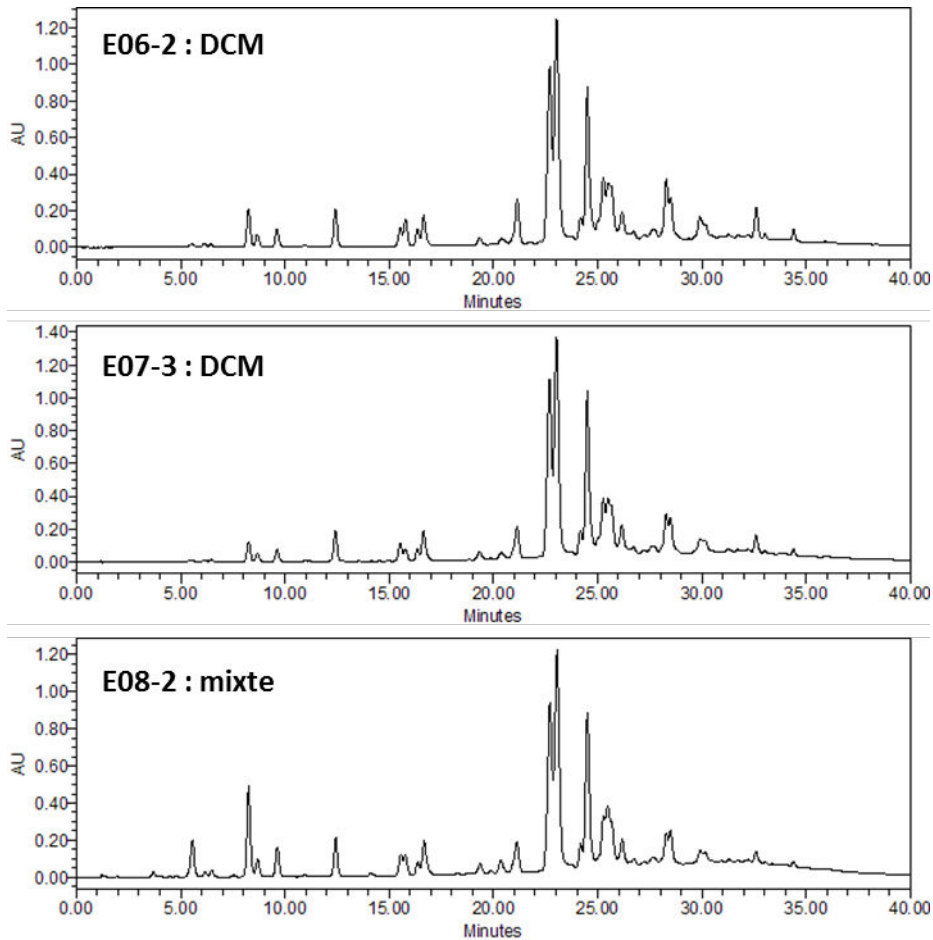


Figure II-9. Profils chromatographiques des extraits E06-2, E07-3 et E08-2 (λ 280 nm, méthode 1)

Une fois de plus, ces profils chromatographiques sont similaires à ceux des extraits E01-03, E04-2 et E05-2. On note cependant des quantités en composés les plus polaires plus faibles pour les extraits DCM E06-2 et E07-3.

4. Dosages spectrophotométriques

Comme cela a été précédemment évoqué, l'analyse qualitative des extraits peut être abordée par le biais de différents dosages globaux tels que ceux des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux ou encore ceux de deux groupes parmi quatre classes majoritairement représentées de flavonoïdes, les flavones et flavonols d'une part et les flavanones et dihydroflavonols d'autre part.

4.1. Dosage des polyphénols totaux

4.1.1. Principe

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu est celle la plus fréquemment utilisée. Le réactif de Folin-Ciocalteu, de couleur jaune, est constitué de polyhétérocycles contenant des acides phosphotungsténique et phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène qui absorbent à 760 nm. Une mesure colorimétrique effectuée à cette longueur d'onde permet ainsi d'apprécier le taux de polyphénols totaux (PT) présents dans l'échantillon.

4.1.2. Taux de polyphénols totaux des différents extraits

Les différents taux de PT des extraits E01 à E08 sont illustrés par la figure II-10 (cf. annexe 1 page 317).

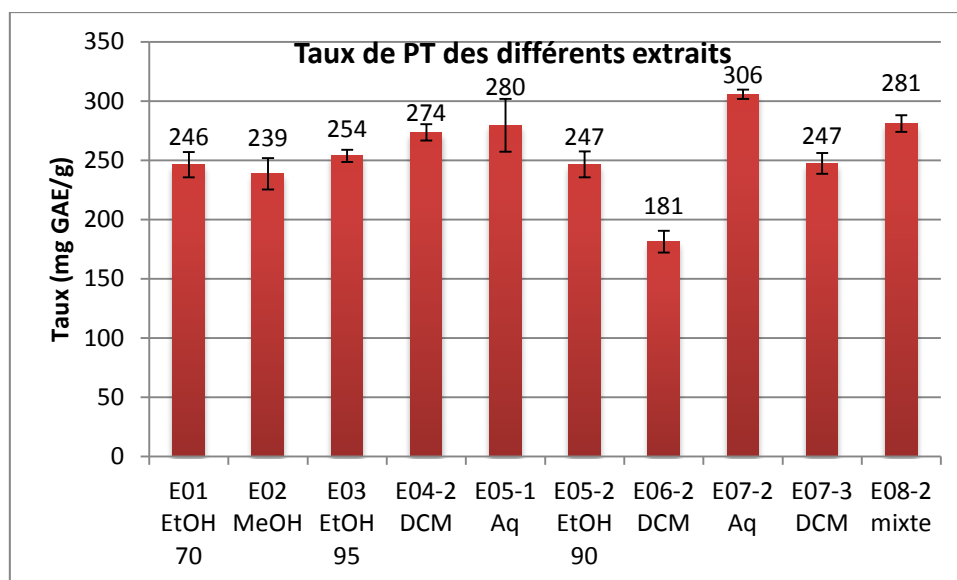


Figure II-10. Taux de polyphénols totaux des extraits E01 à E08

Les taux de PT varient de 181 à 306 mg GAE/g. S'agissant d'une propolis collectée en zone tempérée, ces résultats (200-300 mg GAE/g) sont conformes à la littérature^{26,51}. Les taux sont légèrement supérieurs pour les extraits aqueux (meilleur taux pour E07-2 : 306 mg GAE/g). Ceci peut s'expliquer par la présence de nombreux composés phénoliques, relativement polaires, hydrosolubles. Le faible taux observé pour l'extrait E06-2 DCM (181 mg GAE/g) s'explique par le fait que ce substrat contient encore des cires et est, par conséquent, moins concentré en polyphénols. Ainsi, l'extrait E07-3 DCM, dénué de ces cires, obtient un meilleur score (247 mg GAE/g) que le précédent. Les taux de PT des extraits alcooliques (E01-03 et E05-2) ne sont pas significativement différents (ANOVA, $P < 0.05$), en moyenne : 246.2 ± 7.5 mg GAE/g). Le taux de l'extrait éthanolique E03 (254 mg GAE/g) est similaire à ceux d'EEP venant d'Ukraine (255 mg GAE/g) et des USA (256 mg GAE/g) mais supérieur voire très supérieur à ceux d'EEP provenant d'Hongrie (242 mg GAE/g), de

Bulgarie (220 mg GAE/g), d'Argentine (212 mg GAE/g), d'Uzbekistan (174 mg GAE/g), du Brésil (120 mg GAE/g), d'Afrique du Sud (100 mg GAE/g) et de Thaïlande (31 mg GAE/g)⁵¹.

4.2. Dosages des flavonoïdes

En complément du dosage des polyphénols totaux, le dosage des flavonoïdes, et plus précisément l'évaluation du taux des deux classes, flavones/flavonols (FF) et flavanones/dihydroflavonols (FD), permet de préciser la qualité des propolis.

4.2.1. Dosage des flavones/ flavonols

Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe stable entre l'atome d'aluminium, possédant une lacune électronique, et les doublets d'électrons libres des atomes d'oxygène de l'hydroxyle en 3 et la cétone en 4 pour les flavonols et de la cétone en 4 et de l'hydroxyle en 5 pour les flavones. Il est toutefois possible qu'AlCl₃ forme un complexe avec les espèces possédant deux phénols en ortho mais il réagira de façon préférentielle (complexes plus stables) avec les flavones et flavonols^{177,178}. Ces complexes, de couleur jaune, sont détectés à 415 nm (Figure II-11).

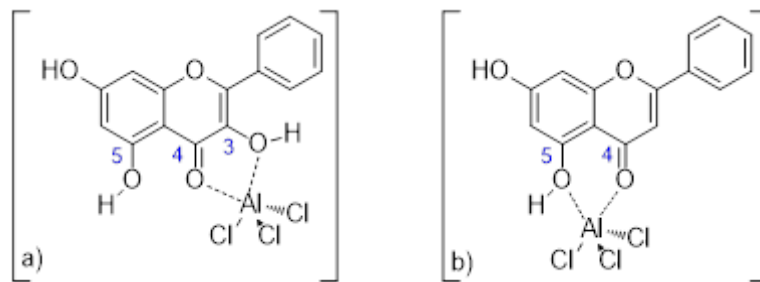


Figure II-11. Complexes stables des flavonols (a) et flavones (b) avec AlCl₃

4.2.2. Dosage des flavanones/ dihydroflavonols

La 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNP) réagit avec les cétones et aldéhydes pour former les 2,4-dinitrophénylhydrazones (Figure II-12) dont le maximum d'absorbance se situe à 495 nm. Ce dosage est sélectif car les flavones et flavonols, qui possèdent une cétone α-β insaturée, ne réagissent pas avec la DNP⁵⁶.



Figure II-12. Réaction d'une cétone avec la DNP

4.2.3. Taux de flavones/ flavonols et flavanones/ dihydroflavonols des différents extraits

Les taux de FF et FD des différents extraits sont présentés sur la figure II-13 (cf. annexe 1).

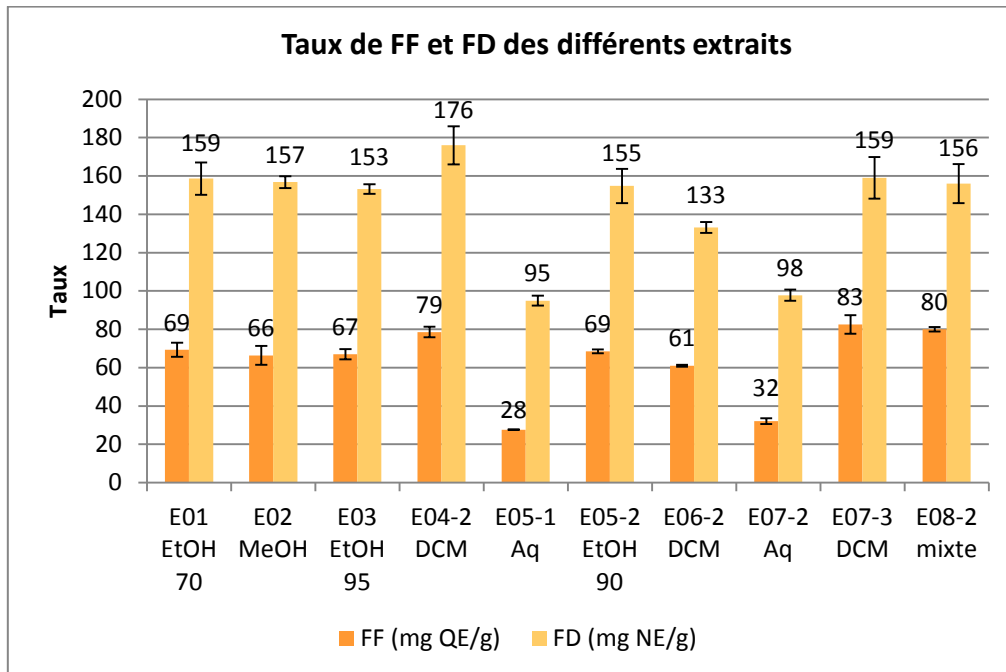


Figure II-13. Taux arrondis de FF et de FD des différents extraits de propolis (n= 3)

Les taux de FF sont compris entre 28 et 83 mg QE/g d'extrait. Les taux retrouvés dans les extraits aqueux E05-1 et E07-2 sont plus faibles que dans les extraits organiques et ceux retrouvés dans les extraits DCM (E04-2 et E07-3) et mixte E08-2 sont plus élevés que les autres. Les extraits alcooliques (E01-03 et E05-2) ne sont significativement pas différents (ANOVA, $P < 0.05$).

Les taux de FD sont eux compris entre 95 et 176 mg NE/g. Ceux des extraits aqueux sont également les plus faibles. En revanche, les écart-types étant plus grands avec ce dosage, les différences entre d'une part les extraits alcooliques et d'autre part les extraits DCM et mixte ne sont plus significatives. On retrouve tout de même une certaine homogénéité entre les extraits alcooliques (différence non significative, ANOVA, $P < 0.05$).

D'ailleurs, si on désire comparer ces valeurs avec la littérature, il est préférable de faire une moyenne de celles des extraits alcooliques soit des taux respectivement pour FF de 67.8 ± 1.3 mg QE/g (soit $6.8 \pm 0.1\%$) et FD de 155.8 ± 2.4 mg NE/g (soit $15.6 \pm 0.2\%$). Mais il s'agit ici de taux (FF et FD) calculés par rapport à l'extrait sec et il arrive que, dans la littérature, les résultats soient donnés en mg/g de propolis brute. Si l'on souhaite ainsi convertir ces données en considérant un rendement extractif moyen (propolis brute) de 67% pour les EEP, on obtient les valeurs de FF de 45.4 ± 1.3 mg QE/g (soit $4.5 \pm 0.1\%$) et de FD de 104.4 ± 2.4 mg NE/g soit (soit $10.4 \pm 0.2\%$). On peut alors comparer nos valeurs avec certains résultats présentés dans la littérature (tableau II-3).

Tableau II-3. Comparaison des taux de FF et FD (ainsi que ceux des PT) de l'extrait moyen alcoolique BFA avec la littérature

Extrait (ref)	FF (%)	FD (%)	PT (%)
EtOH BFA (par rapport à l'extrait)	6.8 ± 0.1	15.6 ± 0.2	24.6 ± 0.6
EtOH BFA (par rapport à la propolis brute)	4.5 ± 0.1	10.4 ± 0.2	16.3 ± 0.6
EtOH type peuplier (Popova <i>et al.</i> 2007) ¹²³	> 4	> 4	> 21
EtOH Espagne (Bonvehi et Guttierrez, 2011) ²³	4.8 ± 1.0	7.9 ± 1.3	27.9 ± 4.0
EtOH Mexique (Velasquez <i>et al.</i> 2007) ⁴⁵	PA : 5.8 ± 0.4 C : 13.1 ± 0.6	15.1 ± 1.8 20.1 ± 3.1	14.8 ± 1.2 25.5 ± 2.6

PA : Pueblo de Alamos ; C : Caborca

L'étude statistique menée par Popova *et al.*¹²³ sur 114 propolis, provenant de différentes régions d'Europe et du Moyen-Orient, a montré qu'une propolis de type peuplier pouvait être définie par des taux minima de FF et FD de 4% et de PT de 21% (par rapport à la propolis brute). La propolis française de BFA remplit bien ces critères pour les taux de FF et FD, mais pas en ce qui concerne le taux de PT supérieur à 21%. Cependant, les méthodes analytiques et les standards utilisés n'étant pas forcément les mêmes (galangine:pinoembrine 2:1 vs acide gallique dans notre cas), il semble très difficile de faire des comparaisons tranchées.

Bonvehi et Gutiérrez²³ ont montré que la propolis du pays basque, au nord-est de l'Espagne, avait un taux de FF compris entre 12 et 78 mg/g (moyenne de 4.8 ± 1.0 %), similaire à la propolis BFA, et de FD [55 à 108 mg/g (moyenne de 7.9 ± 1.3 %)] légèrement inférieur à la propolis française. De plus, Velasquez *et al.*⁴⁵ ont décrit la composition polyphénolique de propolis provenant du Sonora (Pueblo de Alamos PA et Caborca C), dans le Nord-Ouest du Mexique, comme étant de type peuplier avec respectivement un taux de FF de 5.8 ± 0.4 et 13.1 ± 0.6 % et un taux de FD de 15.1 ± 1.8 et 20.1 ± 3.1 %, bien supérieurs aux minima mentionnés par Popova. Ainsi, même au sein du type peuplier, il existe d'importantes variations en termes de taux de polyphénols et de flavonoïdes.

5. Identification des composés

5.1. Etude déréplicative

5.1.1. Définition

La détermination de la composition chimique de la propolis de BFA a débuté par une étude déréplicative par HPLC/DAD/MS. La déréplication consistait ici en l'identification de composés par comparaison de leurs temps de rétention, profils UV et données de masse avec les données de la littérature scientifique, sans purification préalable.

5.1.2. Identification des premiers composés

Les acides caféique (composé **4**), *p*-coumarique (**7**) et férulique (**8**) furent les premiers composés identifiés, suivis par l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (**11**) et la chryisine (**34**), grâce à la déréplication mais également par comparaison avec des standards commerciaux (Figure II-14). Les numéros des composés sont attribués par ordre d'élution dans le chromatogramme de l'extrait DCM en fin de chapitre (section 5.2.3 page 101) et non par chronologie d'identification.

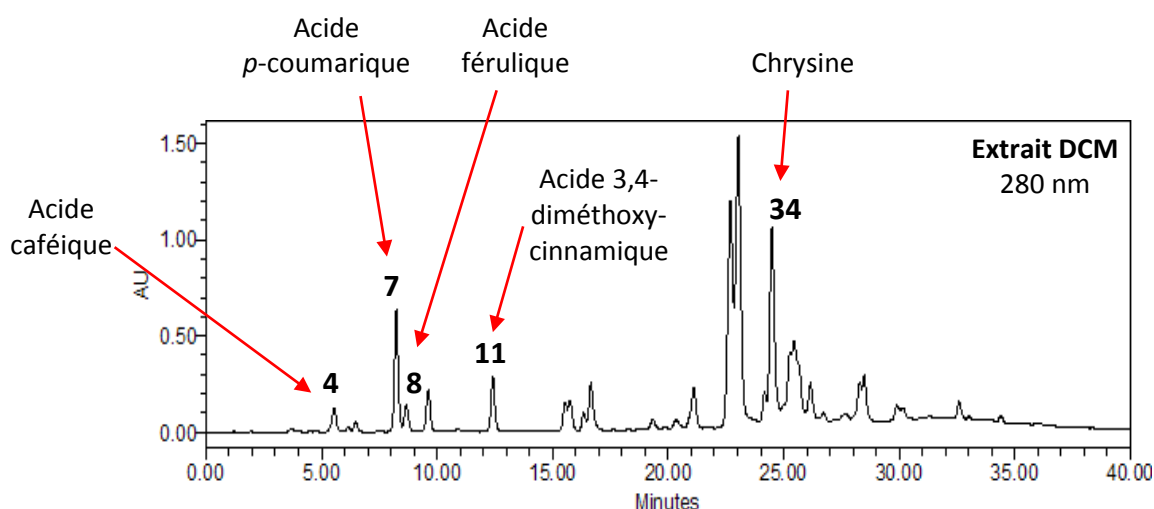


Figure II-14. Premiers composés identifiés par déréplication et comparaison avec témoins commerciaux

Plus que le temps de rétention (les conditions chromatographiques d'une publication à l'autre varient légèrement), l'ordre d'élution, dans un environnement résolutif donné, est toujours respecté et donne donc de précieuses informations. Ainsi les acides caféique, *p*-coumarique et férulique ont-ils été déjà fréquemment rencontrés dans plusieurs propolis^{8,24,51}, et donc respectivement dans cet ordre.

a) Exemple d'identification n°1 : l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (11) (déréplication)

La figure II-15 montre le profil chromatographique de E01 comportant un pic "x" à identifier.

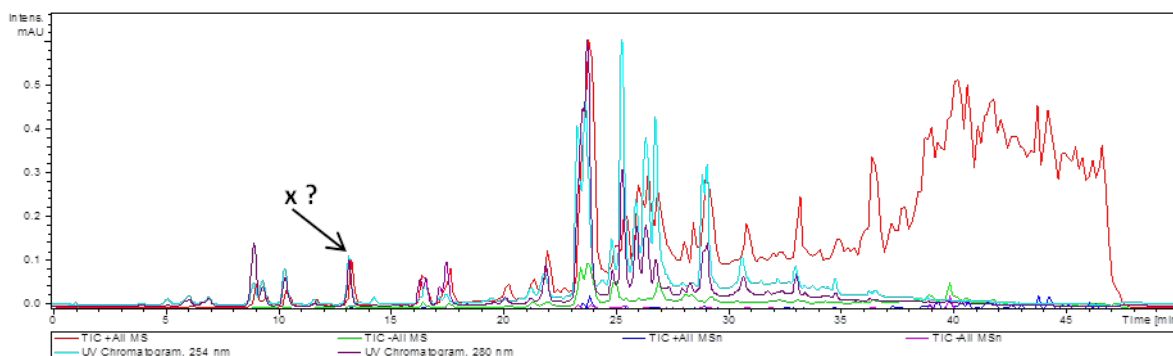


Figure II-15. Chromatogramme HPLC de E01 regroupant les courants ioniques totaux (TIC) (+ MS: rouge, -MS: vert) et les absorbances enregistrées à 254 (bleu clair) et 280 nm (violet)

Les spectres de masse ESI en modes négatif (-MS) et positif (+MS) associés au pic d'intérêt sont présentés à la figure II-16.

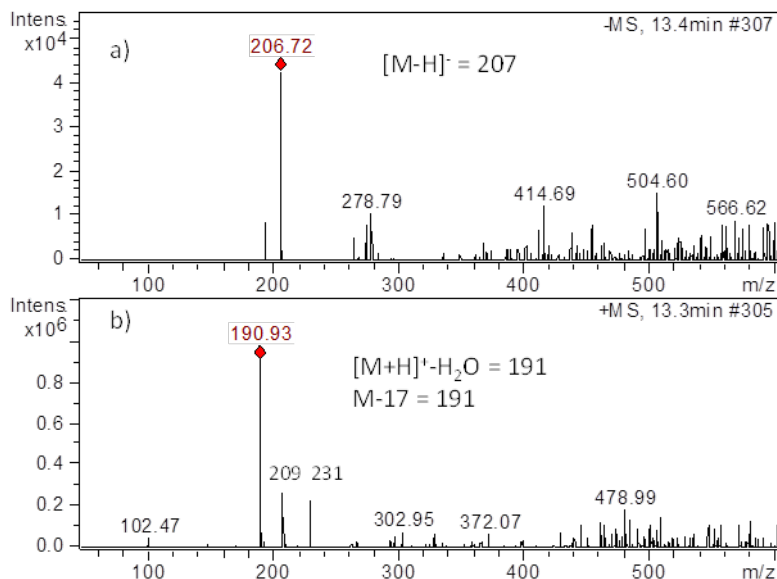


Figure II-16. Spectres de masse en mode négatif (a) et positif (b) du composé 11 (pic x)

L'ion quasi moléculaire $[M-H]^-$ apparaît à m/z 207, ce qui pourrait correspondre à une masse molaire $M=208$ g/mol. En mode positif, on observe des $[M+H]^+$ (m/z 209) et $[M+Na]^+$ (m/z 231), mais surtout un fragment intense à m/z 191, soit $M-17$ soit $[M+H]^+ - H_2O$ (209-18 uma). Une perte de molécule d'eau est fréquemment rencontrée dans le cas d'acides carboxyliques conjugués. Ceci confirme donc la masse molaire de 208 g/mol.

Le spectre UV quant à lui apparaît proche de celui des acides caféique et férulique (Figure II-17).

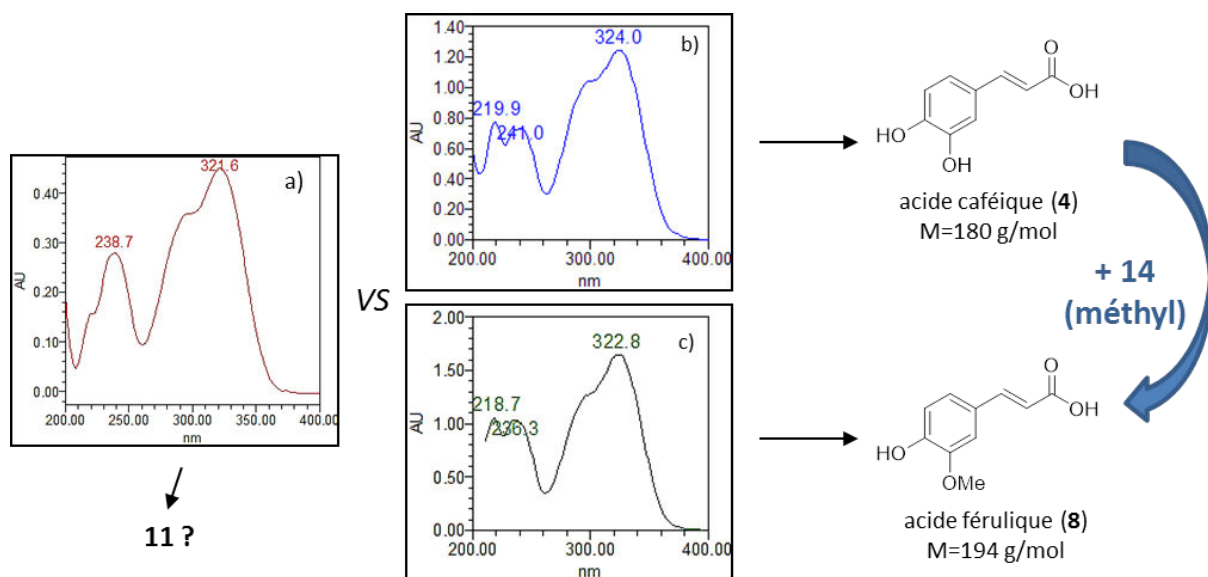
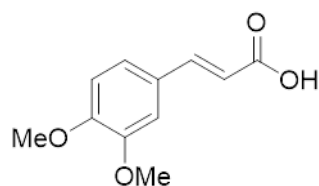


Figure II-17. Spectres UV du composé 11 (a) et des acides caféique (b) et férulique (c)

Ainsi, on peut supposer que le composé possède une structure proche de celle des acides caféique et férulique, avec un groupement méthyle additionnel par rapport à l'acide férulique ($M = 194 + 14 = 208$ g/mol). **11** serait donc l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (Figure II-18).



Acide 3,4-diméthoxycinnamique (**11**)
M = 208 g/mol

Figure II-18. Structure de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (11)

Cette hypothèse est ensuite confirmée par l'analyse des données de la littérature⁶³ :

- UV λ_{\max} : 296, 322 nm
- -MS : $[M-H]^-$ à m/z 207 et fragmentation MS^2 à m/z 163
- +MS : $[M+H]^+$ à m/z 209 et fragmentations MS^2 à m/z 191, 163 et 133

Quand l'identification est plus difficile, ou lorsque plusieurs composés présentent une même masse molaire, les fragmentations MS^2 sont prises en compte.

b) Exemple d'identification n°2 : la chryisine (34) (déréplication + témoin)

De même que précédemment, on sélectionne un pic **y** sur le chromatogramme HPLC de E01 (Figure II-19) et la figure II-20 montre les spectres de masse -MS et UV du pic **y**.

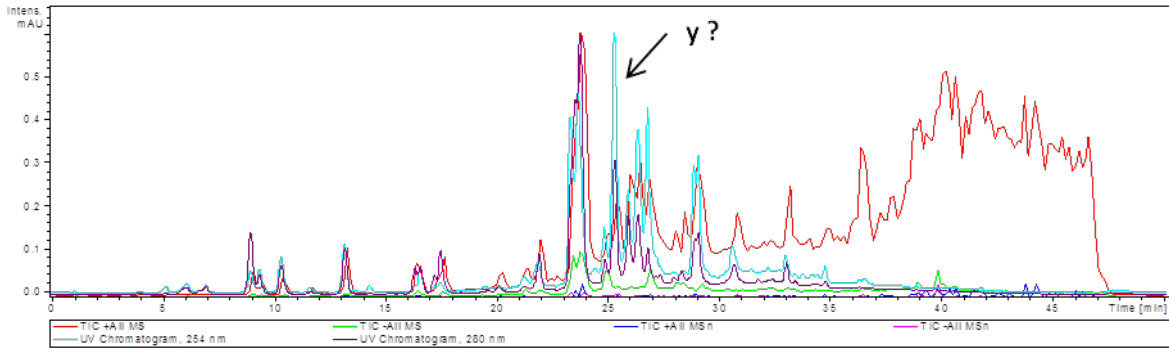


Figure II-19. Chromatogramme HPLC de E01 regroupant les courants ioniques totaux (TIC) (+ MS: rouge, -MS: vert) et les absorbances enregistrées à 254 (bleu clair) et 280 nm (violet)

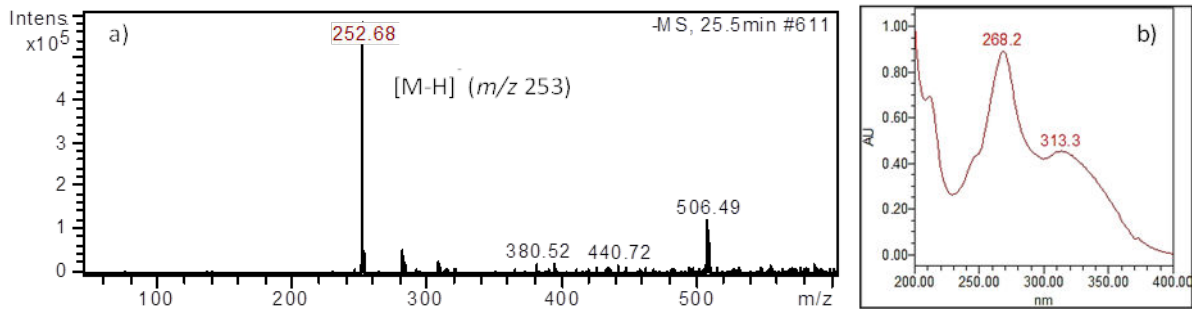


Figure II-20. Spectre de masse ESI (-MS) du composé 34 (a) et son spectre UV (b) (pic y)

Une recherche bibliographique rapide⁶³ nous informe que ce composé avec un [M-H]⁻ à m/z 253 (soit M=254 g/mol) et λ_{max} à 268 et 314sh nm pourrait être la chryisine. Le standard commercial (Chryisine, Acros, 99%) a été analysé dans les mêmes conditions. Les résultats sont représentés par la figure II-21.

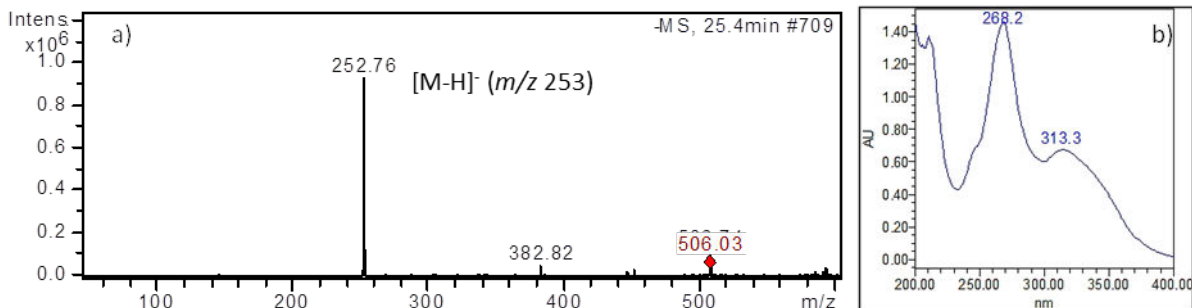
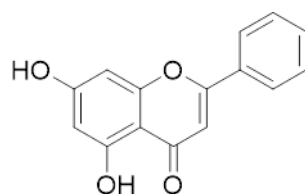


Figure II-21. Spectre de masse ESI (-MS) de la chryisine commerciale (a) et son spectre UV (b)

Les temps de rétention sont quasiment identiques ainsi que les spectres -MS et UV. Le composé **34** est donc bien la chryisine (Figure II-22).



Chrysin (34)
M = 254 g/mol

Figure II-22. Structure de la chrysin (34)

Les composés **4**, **7**, **8**, **11** et **34** ont, de cette façon, pu être identifiés avec certitude. Pour les autres, le fractionnement d'un extrait de propolis s'est avéré nécessaire afin dans un premier temps d'approfondir l'analyse dérégulative puis, dans un second temps, de purifier les composés et de procéder à des analyses structurales individuelles.

5.2. Identification structurale

Une étude préliminaire a consisté à analyser, en HPLC/UV et RMN ^1H , six composés commerciaux, appartenant à des familles de composés différentes et fréquemment rencontrées dans les propolis : les acides caféique, *p*-coumarique et férulique, la chrysin, la quercétine et la naringénine (cf. annexe 2 page 318). Le profilage chimique exhaustif de la propolis BFA a ensuite été entrepris à partir des différentes fractions obtenues après le fractionnement de l'extrait E09-2 DCM.

5.2.1. Composés déjà connus

Les fractions CF2-2 et CF2-17 ont été les premières à être étudiées car leurs chromatogrammes présentaient, à 280 nm, un seul pic majoritaire.

a) Fraction CF2-2 (composé 47)

Les analyses HPLC/UV de la fraction CF2-2 sont représentées sur la figure II-23.

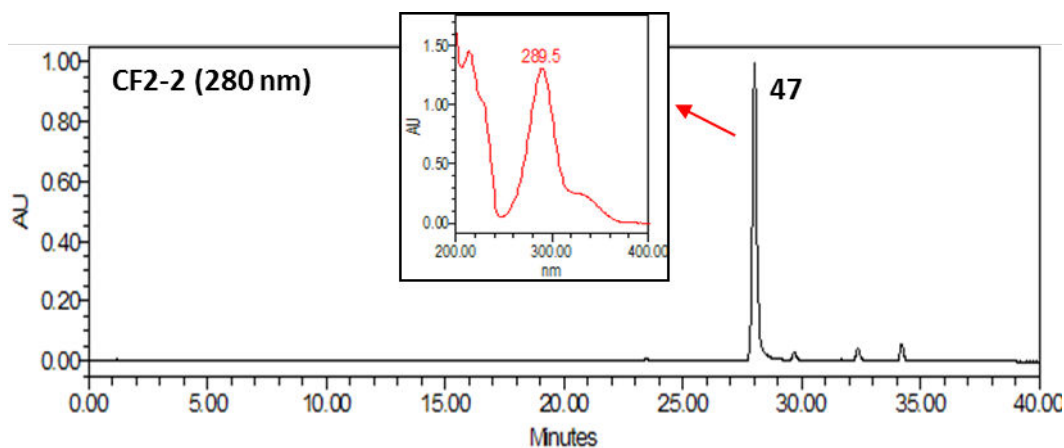


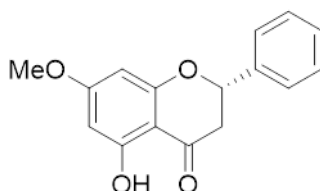
Figure II-23. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-2 et profil UV du composé 47

Le composé **47** possède un spectre UV (λ_{\max} 290 et 330sh nm) caractéristique des flavanones/dihydroflavonols. De plus, l'analyse ESI-MS a révélé les m/z suivants :

- +MS : $[M+H]^+$ 271, $[M+Na]^+$ 293,
- -MS : $[M-H]^-$ 269,

ce qui correspond à une masse molaire $M=270$ g/mol.

La RMN du proton, réalisée dans $CDCl_3$, nous indique la présence d'un motif flavanone (3 dd à δ 2.83, 3.11 et 5.43 ppm), d'un groupement méthoxye OCH_3 (s à δ 3.82 ppm) et d'un groupement phényle (multiplet d'intégration 5 à δ 7.43 ppm). On note également la présence d'un proton phénolique à δ 12.02 ppm. Il s'agit du proton de l'hydroxyle en position 5 qui forme une liaison hydrogène avec l'oxygène de la cétone. Ainsi, en se référant aux données de la littérature^{31,71,74,179}, le composé **47** est-il identifié à la pinostrobinine (Figure II-24).



Pinostrobinine (47)
M = 270 g/mol

Figure II-24. Structure de la pinostrobinine (47)

L'ensemble des données spectrales de **47** et de tous les autres composés identifiés est donné en annexe 3 page 325.

b) Fraction CF2-17 (composé 31)

Les analyses HPLC/UV de la fraction CF2-17 sont représentées sur la figure II-25.

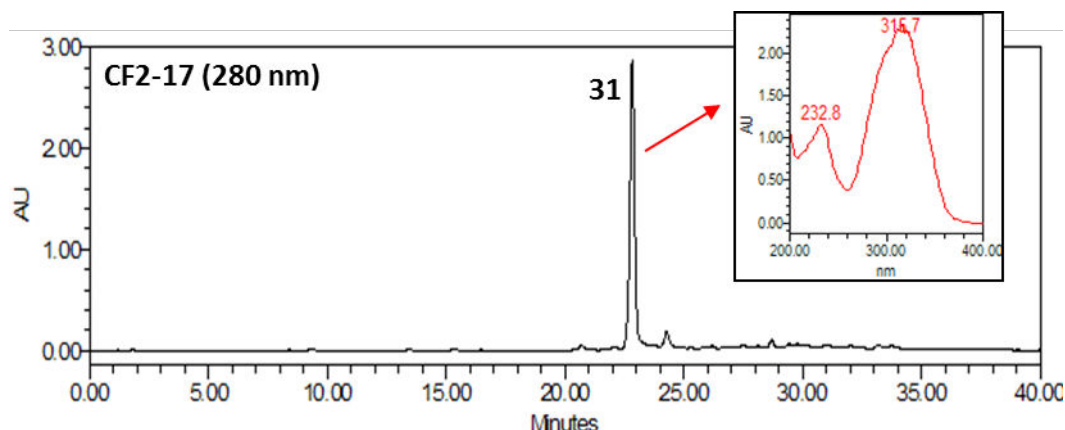


Figure II-25. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-17 et profil UV du composé 31

Le composé **31** présente un λ_{\max} à environ 316 nm, caractéristique du motif *p*-coumarique. L'analyse ESI-MS a révélé en mode négatif un $[M-H]^-$ à m/z 425 et $[2M-H]^-$ à m/z 851. La masse molaire de ce composé est donc $M = 426$ g/mol.

La RMN du proton, réalisée dans le DMSO- d_6 , nous informe quant à elle sur la présence d'un motif glycérol (2 dd d'intégration 2 vers δ 4.40-4.30 ppm et un multiplet d'intégration 1 à δ 5.28 ppm), d'un motif acétate (s d'intégration 3 à δ 2.08 ppm) et, du fait de l'intégration, sur la présence de deux groupements *p*-coumarates (Figure II-26).

Composé 31, DMSO, 270 MHz

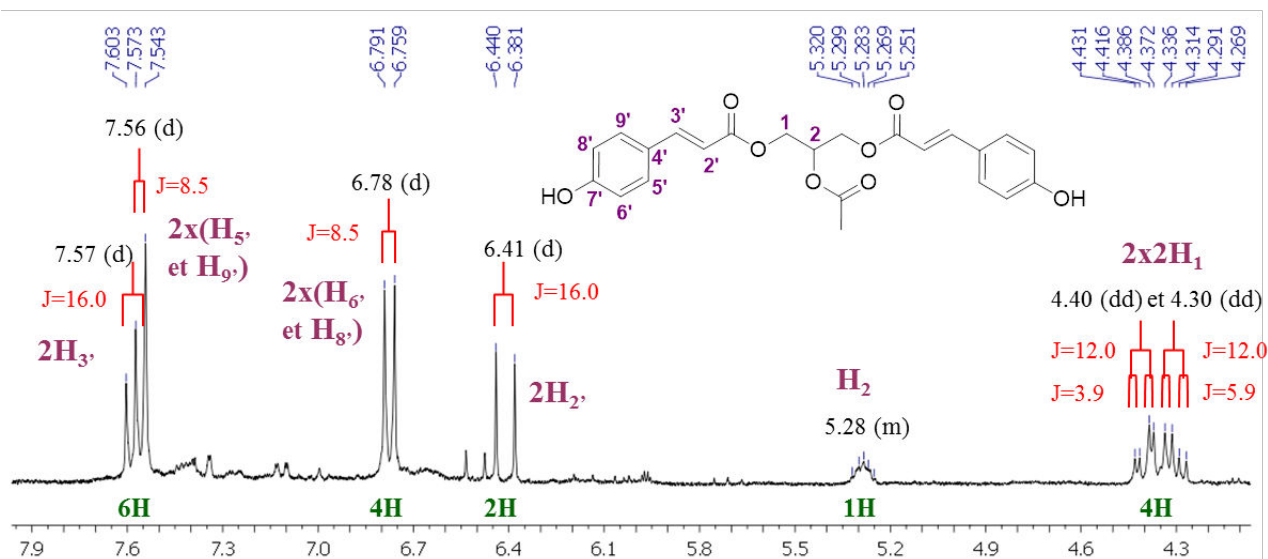
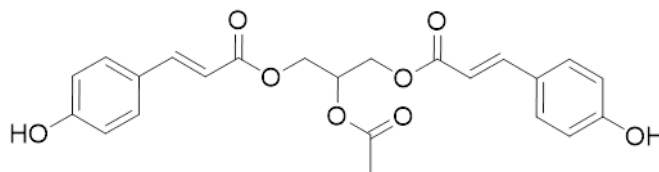


Figure II-26. Spectre RMN ^1H (zone δ 4.1-7.9 ppm) du composé 31 (270 MHz, DMSO- d_6 , δ_{TMS} 0 ppm)

Le composé **31** correspond donc au 2-acétyl-1,3-di-(E)-coumaroylglycérol^{31,103} (Figure II-27).



2-acétyl-1,3-di-(E)-coumaroylglycérol (31)

M = 426 g/mol

Figure II-27. Structure du 2-acétyl-1,3-di-(E)-coumaroylglycérol (31)

c) Fraction CF2-19 (composés 9 et 13)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-19 sont regroupées sur la figure II-28.

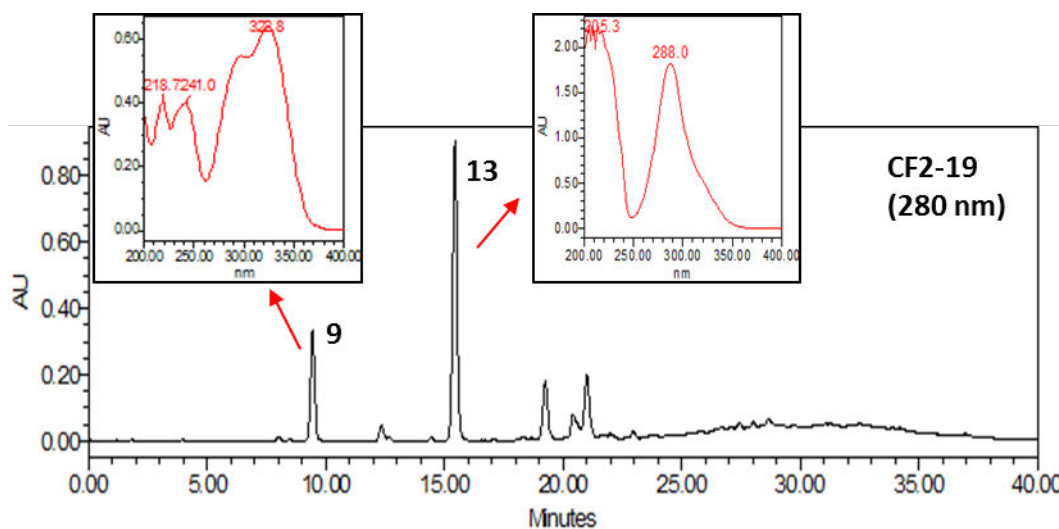
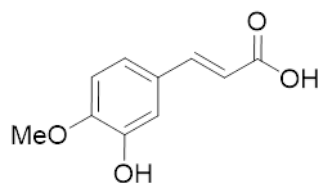


Figure II-28. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-19 et profils UV des composés 9 et 13

Les analyses ESI-MS fournissent les m/z suivants :

- Composé **9** : -MS : [M-H]⁻ 193
+ MS : [M+H]⁺ 195, [M+H]⁺-H₂O 177 soit M= 194 g/mol.
- Composé **13** : -MS : [M-H]⁻ 285, [2M-H]⁻ 571
+ MS : [M+H]⁺ 287, [M+Na]⁺ 309, [2M+Na]⁺ 595 soit M=286 g/mol.

La fraction CF2-19 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF4.CF2-19 : conditions décrites dans la partie expérimentale). Le composé **9** a pu être isolé et analysé en RMN du proton. Son spectre ressemble à celui de l'acide férulique (signaux caractéristiques entre δ 6.2 et 7.6 ppm et un méthoxy à δ 3.88 ppm) et sa masse molaire correspond également à celle de l'acide férulique. Il s'agit donc soit de l'acide isoférulique soit du caféate de méthyle. Comme en spectrométrie de masse, une perte d'eau caractéristique des acides est observée ([M+H]⁺-H₂O), le composé **9** de la fraction CF2-18 élué après 9-10 min est l'acide isoférulique^{63,74} (Figure II-29).

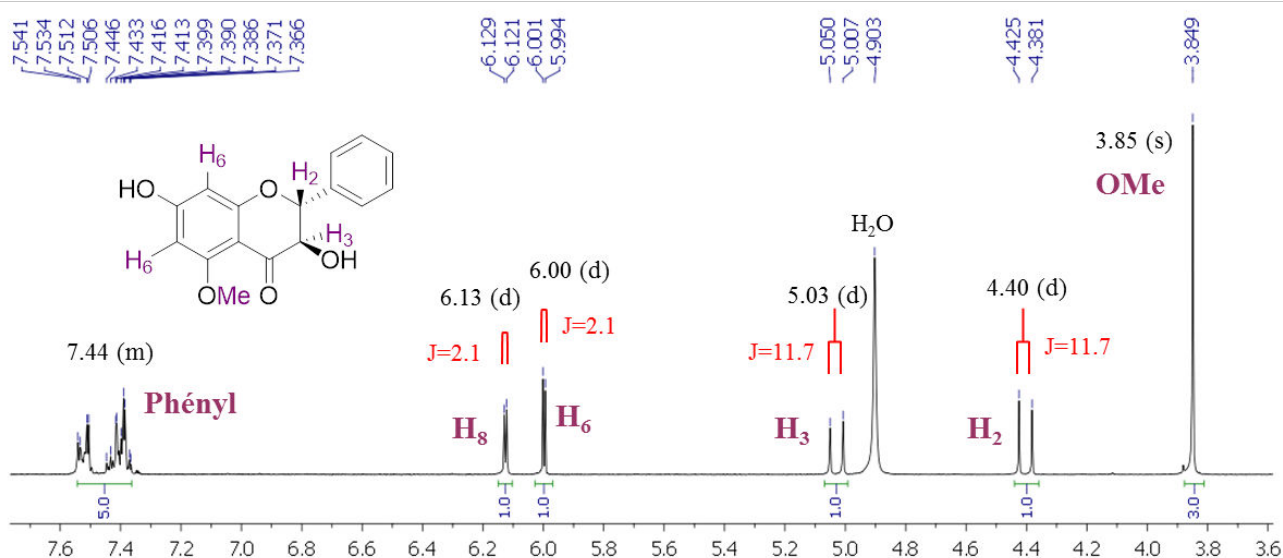


Acide isoféruleique (9)

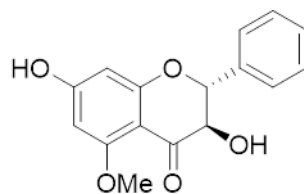
M = 194 g/mol

Figure II-29. Structure de l'acide isoféruleique (9)

Le composé **13**, quant à lui, présente un spectre UV (λ_{\max} 288, 330sh nm) caractéristique des flavanones/dihydroflavonols pour une masse molaire M=286 g/mol. L'analyse par RMN ^1H indique la présence d'un motif dihydroflavonol (2 doublets de constante de couplage $J=11.7$ Hz à δ 4.40 et 5.03 ppm), et d'un groupement méthoxyle (s à δ 3.85 ppm) (Figure II-30).

Composé 13, CD_3OD , 270 MHzFigure II-30. Spectre RMN ^1H (zone δ 3.6-7.6 ppm) du composé **13** (270 MHz, CD_3OD , δ_{TMS} 0 ppm)

D'après la littérature^{63,74} et son temps de rétention (15-16 min), le composé **13** est la 5-méthylpinobanksine (Figure II-31).



5-méthylpinobanksine (13)

M = 286 g/mol

Figure II-31. Structure de la 5-méthylpinobanksine (13)

d) Fraction CF2-6 (composés 10, 26, 37 et 38)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-6 sont regroupées sur la figure II-32.

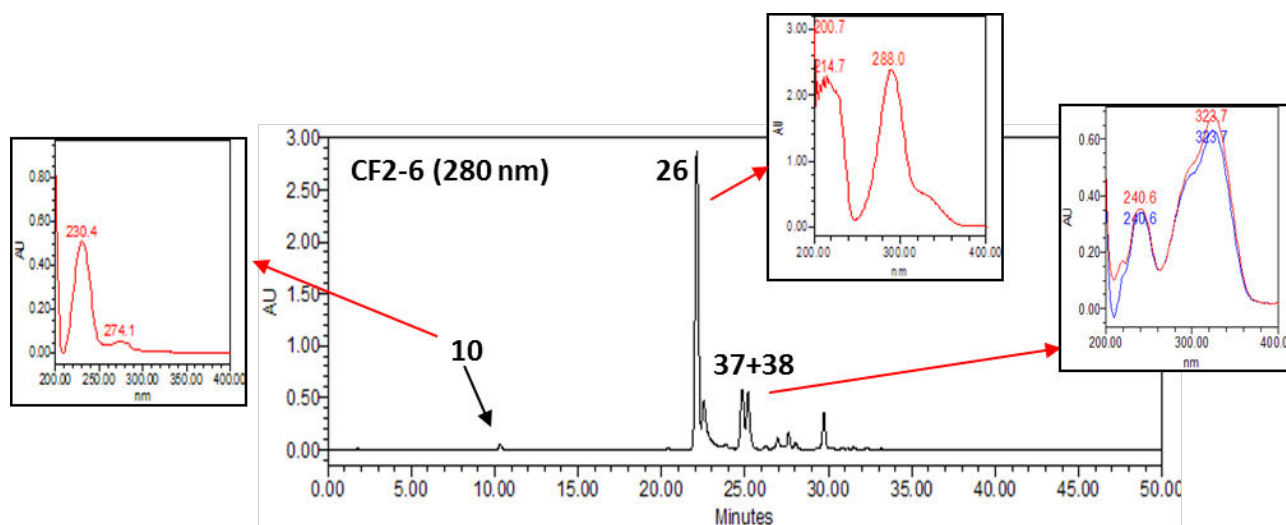
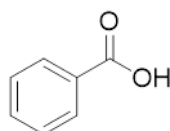


Figure II-32. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-6 et spectres UV des composés 10, 26, 37 et 38

L'analyse ESI-MS a révélé les m/z suivants :

- Composé **10** : -MS : $[M-H]^-$ 121 soit $M=122$ g/mol.
- Composé **26** : -MS : $[M-H]^-$ 255 ; + MS : $[M+H]^+$ 257 soit $M=256$ g/mol.
- Composé **37** : -MS : $[M-H]^-$ 283
+ MS : $[M+Na]^+$ 307, $[2M+Na]^+$ 591 soit $M=284$ g/mol.
- Composé **38** : -MS : $[M-H]^-$ 261
+ MS : $[M+Na]^+$ 285, $[2M+Na]^+$ 547 soit $M=262$ g/mol.

La fraction CF2-6 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF5.CF2-6). Le profil UV (λ_{\max} 230, 274 nm), la masse molaire $M=122$ g/mol et l'analyse RMN 1H , qui montre un motif phényl, nous permettent d'identifier le composé **10** comme étant tout simplement l'acide benzoïque^{13,74,180} (figure II-33).



Acide benzoïque (10)
 $M = 122$ g/mol

Figure II-33. Structure de l'acide benzoïque (10)

Quant au composé **26**, son spectre UV (λ_{\max} 288, 330sh nm) nous indique qu'il appartient à la famille des flavanones/dihydroflavonols et possède une masse molaire de 256 g/mol. La RMN 1H nous

précise que ce composé contient un motif flavanone (3 dd à δ 2.77, 3.10 et 5.47 ppm) mais aussi les protons aromatiques H_6 et H_8 à δ 5.89 et 5.93 ppm et un groupement phényl (m à δ 7.43 ppm) (Figure II-34).

Composé 26, CD₃OD, 270 MHz

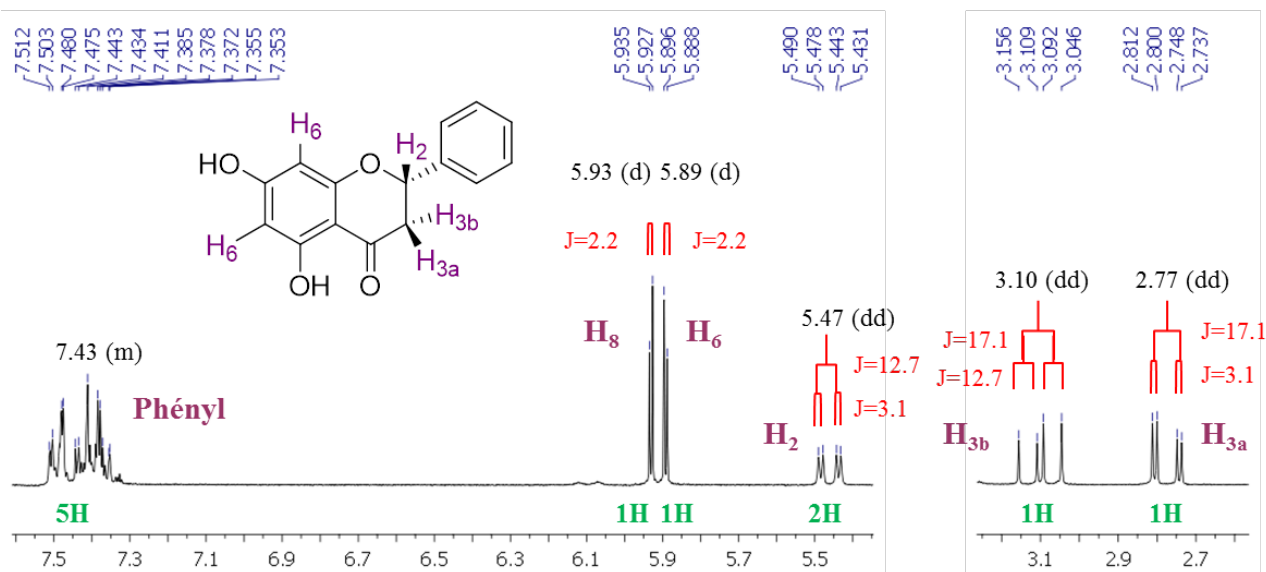


Figure II-34. Spectre RMN ¹H (zones δ 2.6-3.2 et 5.4-7.6 ppm) du composé 26 (270 MHz, CD₃OD, δ_{TMS} 0 ppm)

D'après la littérature^{63,71,74,181} et le temps de rétention (22 min), le composé **26** est la pinocembrine (Figure II-35).

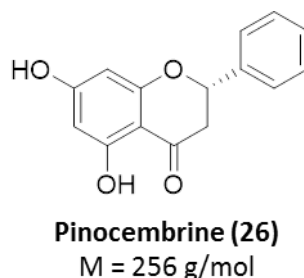


Figure II-35. Structure de la pinocembrine (26)

Les composés **37** et **38** n'ont pu être séparés et leurs spectres UV (λ_{max} 290, 324 nm) sont très proches. Ce sont donc deux dérivés de l'acide caféique. Les RMN ¹H (Figure II-36) et ¹³C nous renseignent sur la présence de deux groupements méthoxyles, et la NOESY sur leur position, ce sont donc tous les deux des férulates (Figure II-37). Les spectres 2D COSY, HMQC et HMBC nous permettent, de plus, de distinguer les deux motifs suivants : benzyle et prényle (3,3-diméthylallyle).

Composés 37 et 38, CD₃OD, 500 MHz

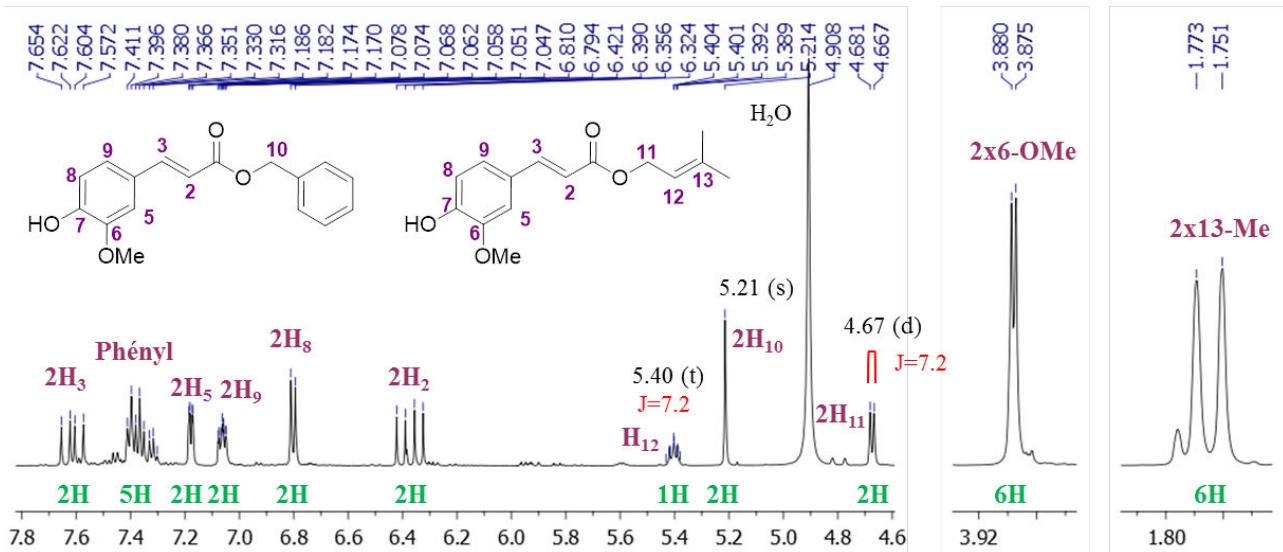


Figure II-36. Spectre RMN ¹H (zones δ 1.7-1.8, 3.8-3.9 et 4.6-7.8 ppm) des composés 37 et 38 (500 MHz, CD₃OD, δ_{TMS} 0 ppm)

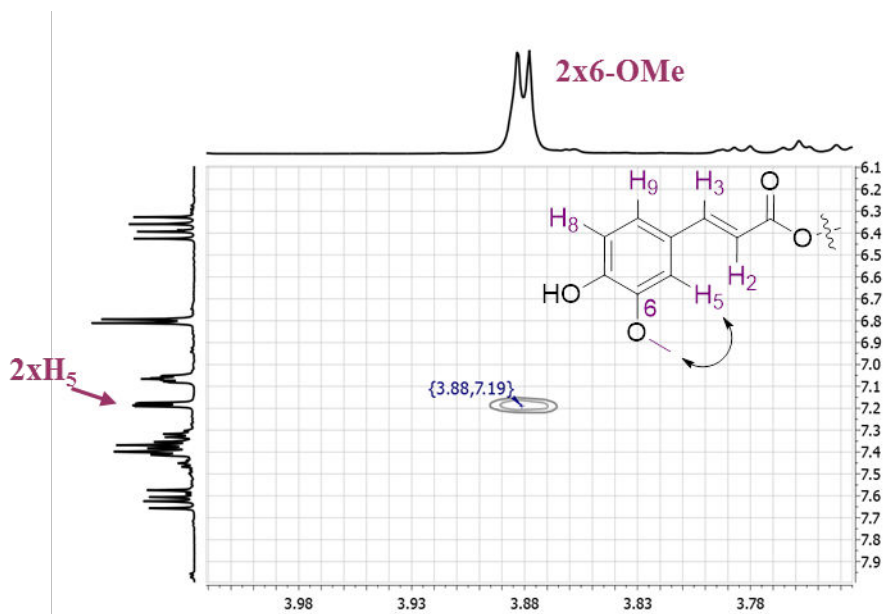


Figure II-37. Spectre NOESY (corrélations 6-OMe et H₅) des composés 37 et 38

Ainsi, d'après leurs temps de rétention (25-26 min), les composés 37 et 38 sont respectivement les férulates de benzyle et de prényle^{31,38,74} (Figure II-38).

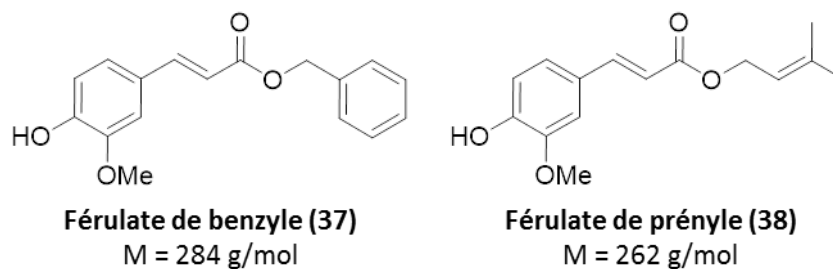


Figure II-38. Structure des férulates de benzyle (37) et de prényle (38)

e) Fraction CF2-8 (composés 14, 29 et 44)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-8 sont regroupées sur la figure II-39.

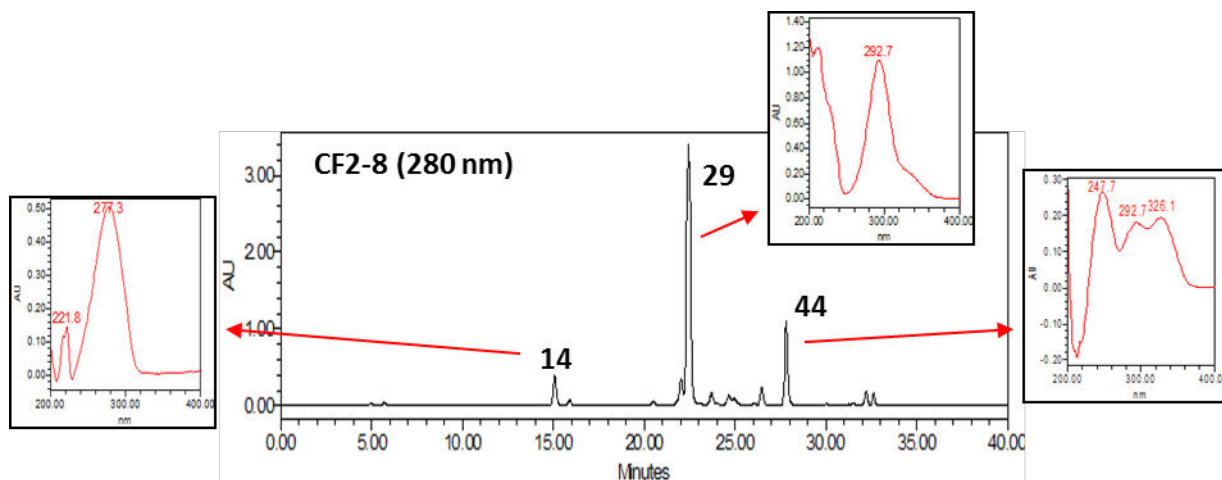
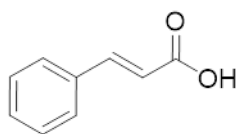


Figure II-39. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-8 et spectres UV des composés 14, 29 et 44

L'analyse ESI-MS donne les m/z suivants :

- Composé **14** : -MS : $[M-H]^-$ 147
+ MS : $[M+H]^+$ 149 ; $[M+H]^+ - H_2O$ 131 soit $M = 148$ g/mol.
- Composé **29** : -MS : $[M-H]^-$ 313 ; + MS : $[M+Na]^+$ 337 soit $M = 314$ g/mol.
- Composé **44** : -MS : $[M-H]^-$ 309 ; + MS : $[M+Na]^+$ 333 soit $M = 310$ g/mol.

La fraction CF2-8 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF6.CF2-8). Le profil UV (λ_{max} 277 nm), la masse molaire $M = 148$ g/mol et l'analyse RMN 1H qui montre un motif phényl et une double liaison *trans*, nous permettent d'identifier le composé **14** comme étant l'acide cinnamique^{63,71,74} (Figure II-40).

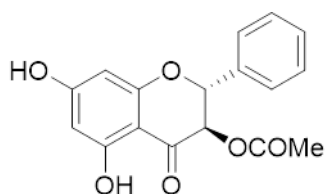


Acide cinnamique (**14**)

$M = 148$ g/mol

Figure II-40. Structure de l'acide cinnamique (**14**)

Quant au composé **29**, son spectre UV (λ_{max} 293, 335sh nm) nous indique qu'il appartient à la famille des flavanones/dihydroflavonols. La RMN 1H nous précise qu'il s'agit d'un dihydroflavonol (2 doublets à δ 5.41 et 5.83 ppm de constante de couplage $J = 11.7$ Hz) avec un groupement acétate (s d'intégration 3 à δ 1.96 ppm) en position 3 (déblindage des signaux des protons H_2 et H_3). Ainsi, d'après une masse molaire de 314 g/mol et le temps de rétention (22-23 min), le composé **29** est la pinobanksine-3-acétate^{31,63,71,74,182} (Figure II-41).



Pinobanksine-3-acétate (29)
M = 314 g/mol

Figure II-41. Structure de la pinobanksine-3-acétate (29)

En ce qui concerne le composé **44**, son spectre UV (λ_{\max} 293, 326 nm) ressemble à celui d'un dérivé de l'acide caféique. Le spectre RMN ^1H nous indique la présence d'un motif férulate ou isoférulate et d'un motif cinnamyle (Figure II-42).

Composé 44, CD₃OD, 270 MHz

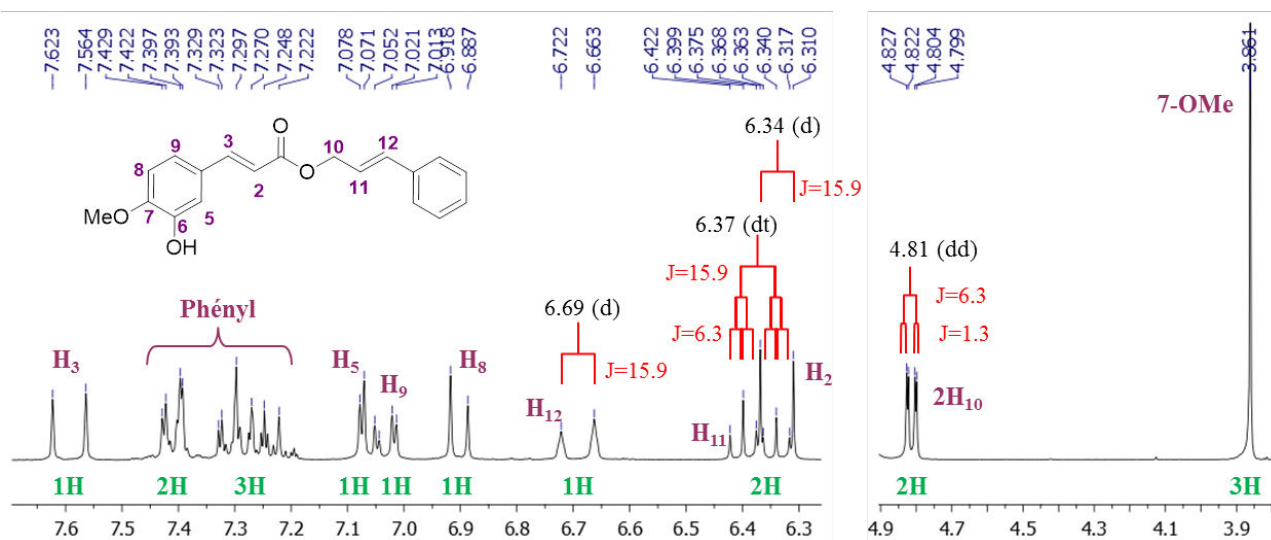


Figure II-42. Spectre RMN ^1H (zones δ 3.8-4.9 et 6.3-7.7 ppm) du composé 44 (270 MHz, CD₃OD, δ_{TMS} 0 ppm)

Le spectre RMN 2D NOESY, nous permet de trancher sur la position du groupement méthoxyle : il est situé à côté du proton H₈ (Figure II-43).

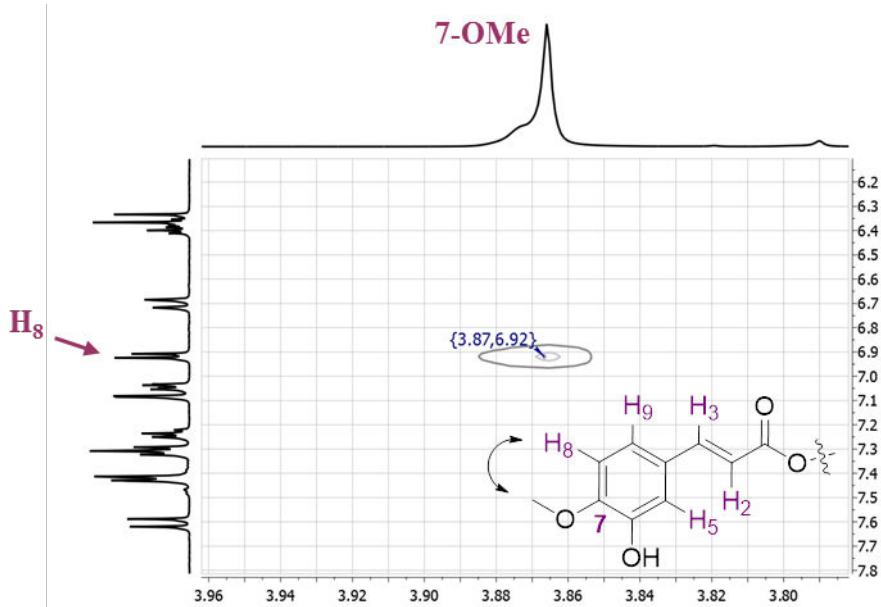
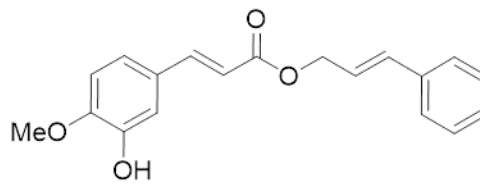


Figure II-43. Spectre NOESY (corrélations 7-OMe et H₈) du composé 44

Le composé 44 est l'isoféruate de cinnamyle^{31,74} (Figure II-44).



Isoféruate de cinnamyle (44)
M = 310 g/mol

Figure II-44. Structure de l'isoféruate de cinnamyle (44)

f) Fraction CF2-13 (composés 1, 2, 16 et 32)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-13 sont regroupées sur la figure II-45.

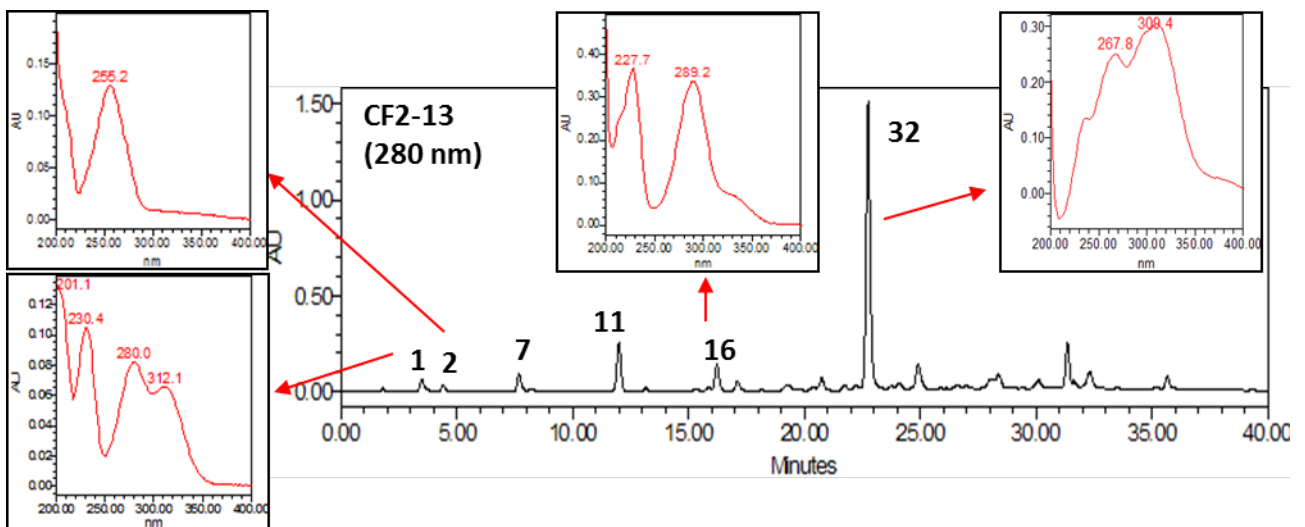


Figure II-45. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-13 et spectres UV des composés 1, 2, 16 et 32

L'analyse ESI-MS a révélé les m/z suivants :

- Composé **1** : -MS : $[M-H]^-$ 137 ; +MS : $[M+H]^+$ 139 soit $M=138$ g/mol
- Composé **2** : -MS : $[M-H]^-$ 137, soit $M=138$ g/mol
- Composé **16** : -MS : $[M-H]^-$ 271 ; $[2M-H]^-$ 543
+MS : $[M+H]^+$ 273, soit $M=272$ g/mol.
- Composé **32** : -MS : $[M-H]^-$ 433 ; fragmentation MS^2 163 ($M=434$ g/mol ?)
+MS : $[M+Na]^+$ 349, $[2M+Na]^+$ 675 ($M=326$ g/mol ?)

Les composés **1** et **2** ont la même masse molaire ($M=138$ g/mol). Cependant, leurs spectres UV sont différents : le composé **1** possède deux bandes alors que le **2** n'en possède qu'une seule. D'après Horton et Robertson¹⁸³, ce dernier pourrait être l'acide 4-hydroxybenzoïque⁴⁴. Pour le composé **1**, il pourrait s'agir du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde^{44,184} (Figure II-46).

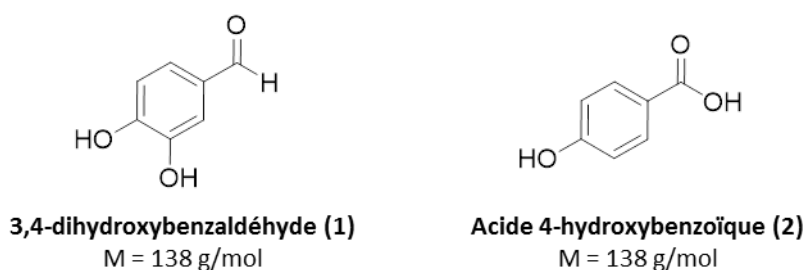


Figure II-46. Structure du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (1) et de l'acide 4-hydroxybenzoïque (2)

La fraction CF2-13 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF7.CF2-13). Le composé **7** a déjà été identifié comme étant l'acide *p*-coumarique et le composé **11** a bien été confirmé en RMN du proton comme étant l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (motif férulate avec 2 singulets d'intégration 3 à δ 3.87 ppm). Le composé **16**, dont le spectre UV (λ_{\max} 289, 330sh nm) est celui d'une flavanone ou d'un dihydroflavonol de masse molaire $M=272$ g/mol, c'est-à-dire soit la naringénine soit la pinobanksine. La RMN 1H nous indique clairement la présence du motif flavanone. Le composé **16** est la naringénine⁷¹ (figure II-47).

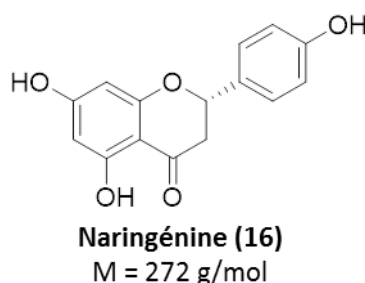


Figure II-47. Structure de la naringénine (16)

Le spectre UV (λ_{\max} 268, 309 nm) du composé **32** semble indiquer la présence d'un groupement *p*-coumaryle (λ_{\max} 309 nm) qui pourrait être confirmé par une fragmentation MS^2 à m/z 163.

Cependant, la masse molaire de ce composé n'a pu être déterminée avec précision. Le composé **32** s'est dégradé au cours de la purification (CF7.CF2.13), sa structure n'a donc pu être élucidée.

g) Fraction CF2-7 (composés 12, 35, 36 et 45)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-7 sont regroupées sur la figure II-48.

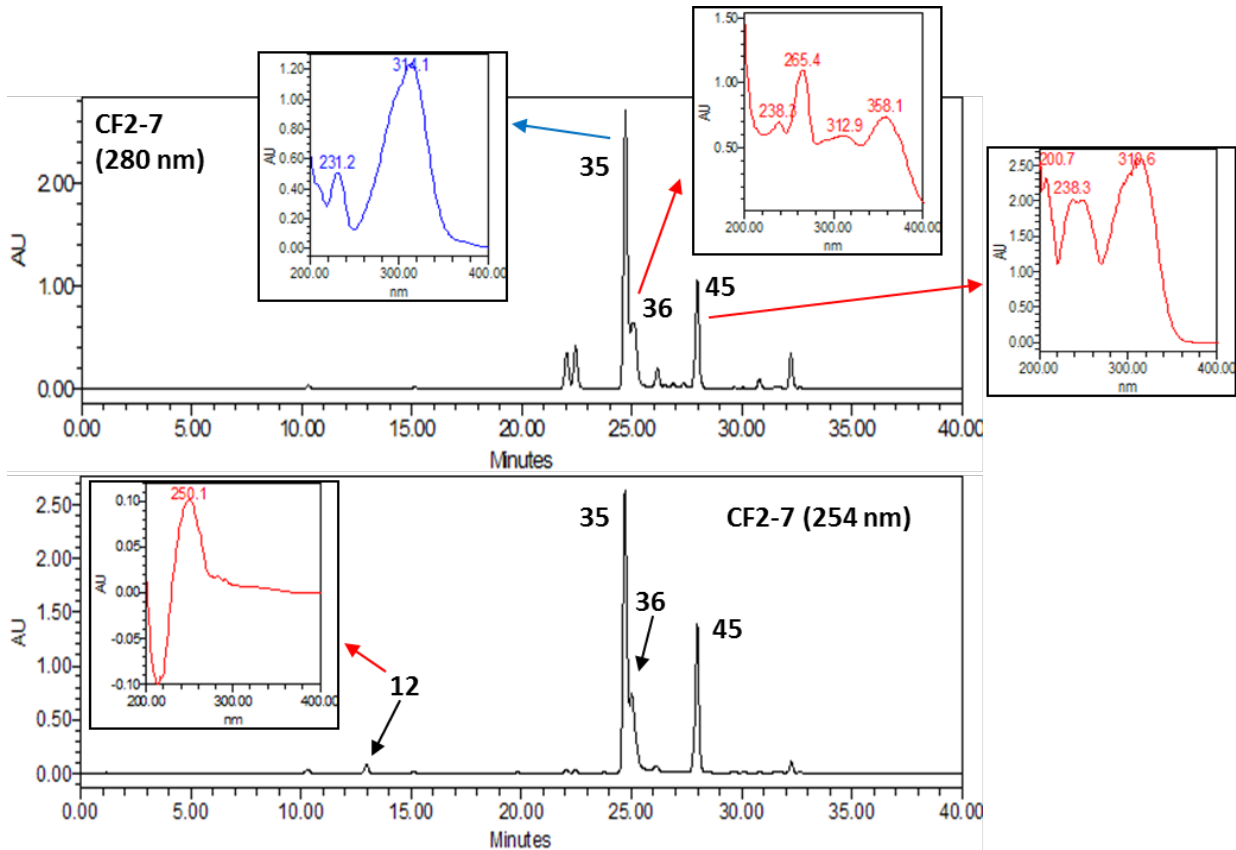


Figure II-48. Chromatogrammes HPLC de la fraction CF2-7 (280 et 254 nm) et spectres UV des composés 12, 35, 36 et 45

L'analyse ESI-MS donne les m/z suivants :

- Composé **12** : -MS : $[M-H]^-$ 149 ; + MS : $[M+Na]^+$ 173 soit $M=150$ g/mol
- Composé **35** : -MS : $[M-H]^-$ 253 soit $M=254$ g/mol
- Composé **36** : -MS : $[M-H]^-$ 269 soit $M=270$ g/mol
- Composé **45** : -MS : $[M-H]^-$ 279 soit $M=280$ g/mol.

La fraction CF2-7 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF8.CF2-7). Le composé **12** présente un spectre UV (λ_{\max} 250 nm) non encore rencontré dans cette identification des constituants de la propolis française et sa masse molaire est relativement faible ($M = 150$ g/mol). Le spectre RMN ^1H nous indique la présence d'un groupement phényle et d'un motif $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ confirmés en RMN ^{13}C (respectivement 6 signaux dans la zone δ 127-143 ppm et deux signaux à δ 32 et 37 ppm) avec en plus un signal d'un carbonyle d'une fonction acide carboxylique à δ 174 ppm (Figure II-49).

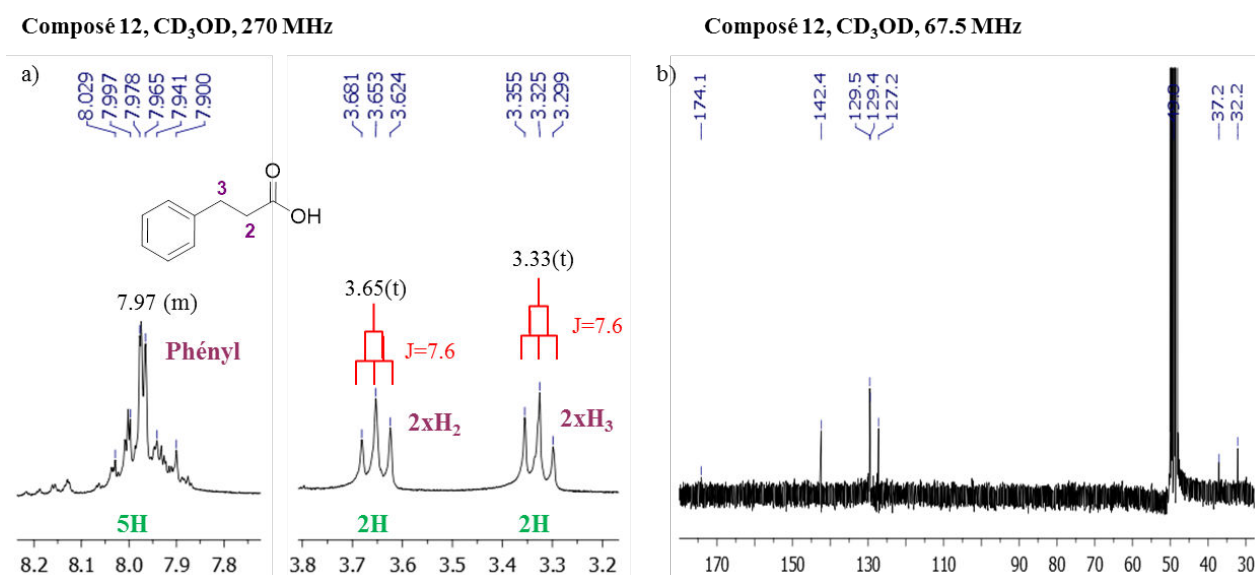
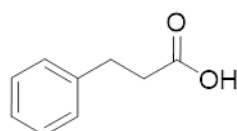


Figure II-49. Spectres RMN ^1H (zones δ 3.2-3.8 et 7.8-8.2 ppm) (a) et ^{13}C (b) du composé **12** (270 MHz (^1H)/ 67,5 MHz (^{13}C), CD_3OD , $\delta_{\text{TMS}} 0$ ppm)

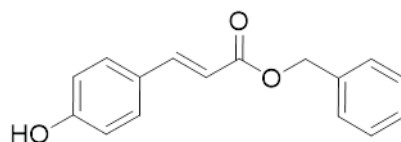
Le composé **12** est l'acide 3-phénylpropanoïque^{74,185} (Figure II-50).



Acide 3-phénylpropanoïque (**12**)
M = 150 g/mol

Figure II-50. Structure de l'acide 3-phénylpropanoïque (**12**)

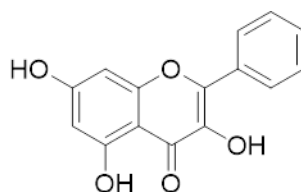
Quant au composé **35**, son spectre UV (λ_{\max} 314 nm) semble indiquer la présence d'un motif p-coumaryle. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C confirment la présence de ce groupement ainsi que celui d'un groupement benzyle. Tenant compte de la masse molaire du composé $M = 254$ g/mol, le composé **35** est le p-coumarate de benzyle^{38,63,74,186} (Figure II-51).



***p*-coumarate de benzyle (35)**
M = 254 g/mol

Figure II-51. Structure du *p*-coumarate de benzyle (35)

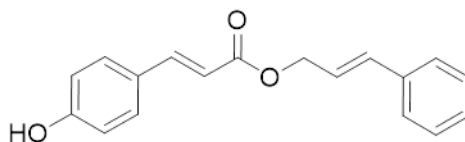
Le composé **36** possède un spectre UV particulier (λ_{\max} 265, 313sh, 358 nm) et sa masse molaire est M=270 g/mol. La littérature⁶³ nous informe qu'il pourrait s'agir de la galangine. Cette structure est confirmée en RMN ¹H par les protons H₆ et H₈ (doublets de constante de couplage $J=2.1$ Hz à δ 6.18 et 6.39 ppm) et le groupement phényle divisé en deux signaux d'intégrations 2 et 3 à δ 8.17 et 7.46 ppm, et en RMN ¹³C par les quinze signaux des carbones correspondants⁷¹. Le composé **36** est bien la galangine^{51,74,187} (Figure II-52).



Galangine (36)
M = 270 g/mol

Figure II-52. Structure de la galangine (36)

Le composé **45** possède un spectre UV (λ_{\max} 314 nm) proche de celui du *p*-coumarate de benzyle (composé **35**) et une masse moléculaire M=280 g/mol (différence de 26 uma). Les spectres RMN ¹H et ¹³C nous confirment la présence du groupement *p*-coumarate et nous indiquent celle d'un groupement cinnamyle. Le composé **45** est identifié comme étant le *p*-coumarate de cinnamyle^{31,63,74} (Figure II-53).



***p*-coumarate de cinnamyle (45)**
M = 280 g/mol

Figure II-53. Structure du *p*-coumarate de cinnamyle (45)

h) Fraction CF2-10 (composés 28 et 30)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-10 sont regroupées sur la figure II-54.

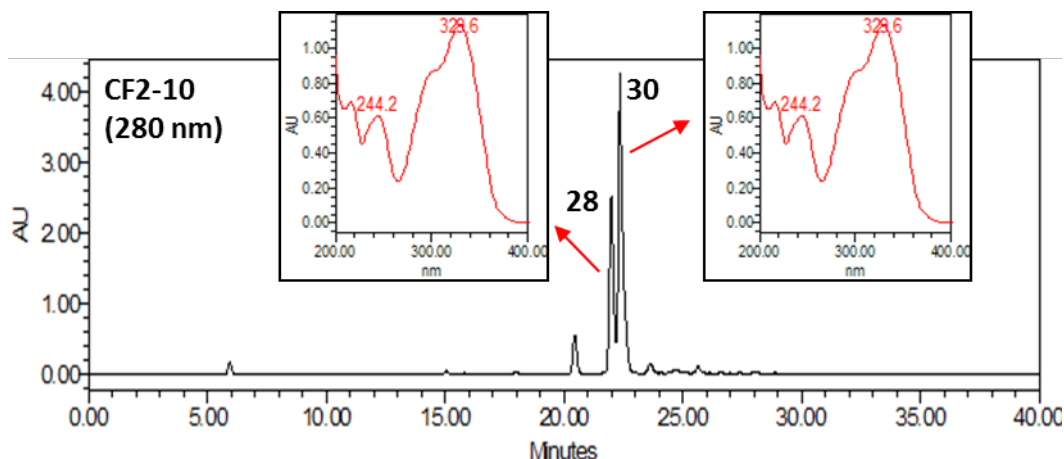


Figure II-54. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-10 et spectres UV des composés 28 et 30

L'analyse ESI-MS fournit les m/z suivants :

- Composé **28** : -MS : $[M-H]^-$ 247 ; $[2M-H]^-$ 495
+ MS : $[M+H]^+$ 249 ; $[M+Na]^+$ 271 ; $[2M+Na]^+$ 519 soit $M=248$ g/mol
- Composé **30** : -MS : $[M-H]^-$ 247 ; $[2M-H]^-$ 495
+ MS : $[M+Na]^+$ 271 ; $[2M+Na]^+$ = 519 soit $M=248$ g/mol également.

Les composés **28** et **30** montrent des spectres UV identiques (λ_{max} 295, 330 nm). Ce sont donc deux dérivés d'acide caféique avec la même masse molaire $M=248$ g/mol. Ces deux composés ayant des temps de rétention très proches, ils n'ont pas pu être séparés. Le spectre RMN 1H du mélange de ces composés indique la présence de deux motifs caféates et nous renseigne, grâce aux différentes proportions en composés **28** et **30**, que le premier contient un groupement isopent-3-ényle (minoritaire) et le second un groupement prényle (majoritaire) (Figure II-55).

Composés 28 et 30, CD₃OD, 270 MHz

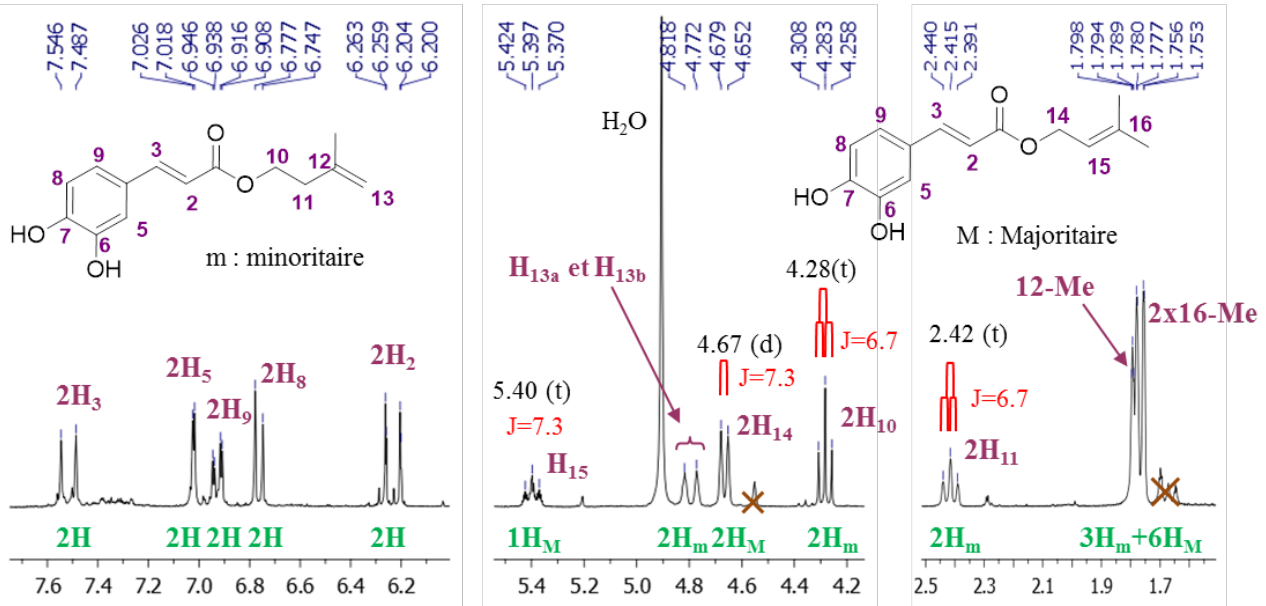


Figure II-55. Spectre RMN ¹H (zones δ 1.6-2.5, 4.2-5.5 et 6.1-7.7 ppm) des composés 28 et 30 (270 MHz, CD₃OD, δ_{TMS} 0 ppm)

Ainsi, le composé **28** est le caféate d'isopent-3-ényle⁷⁴ et le composé **30** le caféate de prényle^{33,63,74} (Figure II-56).

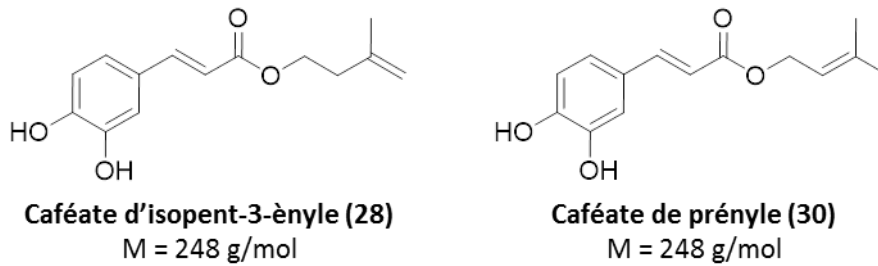


Figure II-56. Structures des caféates d'isopent-3-ényle (28) et de prényle (30)

i) Fraction CF2-9 (composés 3, 5, 6, 17, 25, 39 et 40)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-9 sont regroupées sur la figure II-57.

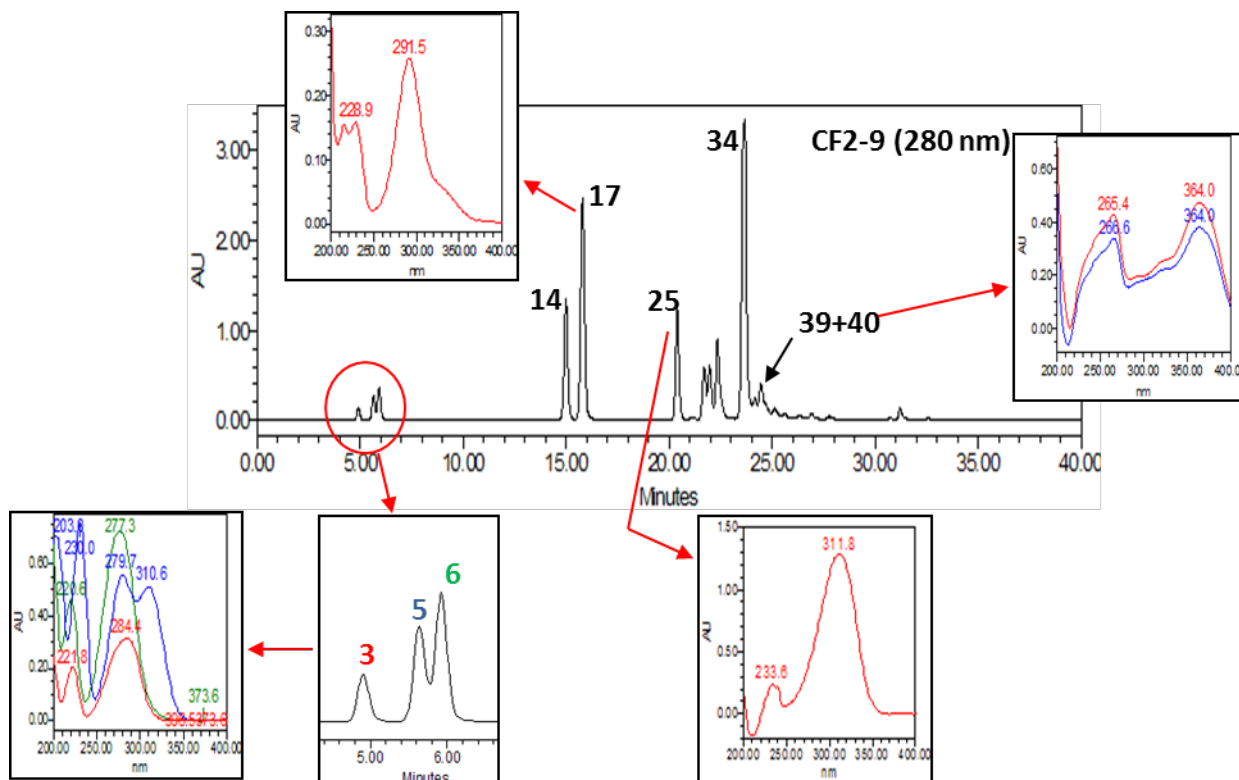


Figure II-57. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-9 et spectres UV des composés 3, 5, 6, 17, 25, 39 et 40

Les composés **14** (acide cinnamique) et **34** (chrysine) ont déjà été identifiés.

L'analyse ESI-MS donne les m/z suivants :

- Composé **3** : -MS : $[M-H]^-$ 121 soit $M=122$ g/mol
- Composé **5** : -MS : $[M-H]^-$ 151 ; + MS : $[M+H]^+$ 153 soit $M=152$ g/mol
- Composé **6** : -MS : $[M-H]^-$ 135 ; + MS : $[M+H]^+$ 137 soit $M=136$ g/mol
- Composé **17** : -MS : $[M-H]^- = 271$;
+ MS : $[M+H]^+$ 273 ; $[M+Na]^+$ 295 ; $[2M+Na]^+$ 567 soit $M=272$ g/mol
- Composé **25** : -MS : $[M-H]^-$ 173 ;
+ MS : $[M+H]^+$ 175 ; $[M+H]^+-H_2O$ 157 soit $M=174$ g/mol
- Composés **39** et **40** : -MS : $[M-H]^-$ 299 ;
+ MS : $[M+H]^+$ 301 ; $[M+Na]^+$ 323 soit $M=300$ g/mol.

La fraction CF2-9 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF9.CF2-9). Les composés **3**, **5** et **6**, tous les trois obtenus dans une seule fraction et donc non séparés, sont des composés polaires (faibles temps de rétention) de faibles masses molaires (respectivement 122, 152 et 136 g/mol). Le composé **3** a la même masse molaire que l'acide benzoïque, mais est beaucoup

plus polaire que celui-ci. Il pourrait donc s'agir d'un hydroxybenzaldéhyde. Le spectre RMN ^1H de cette fraction (Figure II-58) nous indique la présence de deux aldéhydes dans des proportions différentes 3:7 (2 singulets vers δ 9.7-9.8 ppm parmi les trois composés aromatiques). Ainsi le premier aldéhyde d'intégration plus faible est composé d'un noyau aromatique avec une substitution en para (2 doublets à δ 6.91 et 7.77 ppm, $J=8.5$ Hz), le composé **3** est le 4-hydroxybenzaldéhyde^{44,188,189}. Le composé **5**, de masse molaire 152 g/mol, c'est-à-dire avec une différence de 30 uma (groupement méthoxyle) par rapport au composé **3**, pourrait être la vanilline ou isovanilline (validée par le spectre UV de la vanilline commerciale : λ_{max} 280, 311 nm). On retrouve ce deuxième aldéhyde d'intégration plus grande, avec trois signaux d'intégration 1 : d ($J=6.6$ Hz) à δ 6.94 ppm, dd ($J=6.6$ et 1.7 Hz) à δ 7.42 ppm et s à δ 7.44 ppm, mais également avec un singulet d'intégration 3 à δ 3.92 ppm (méthoxyle). Le spectre 2D NOESY indique que le groupement méthoxyle se situe à proximité du singulet à δ 7.44 ppm (H_7). Le composé **5** est la vanilline^{8,44,74,189}. Quant au composé **6**, de masse molaire $M=136$ g/mol, son spectre UV correspond à celui du 4-hydroxyacétophénone (λ_{max} 276 nm)¹⁸³. Ce composé¹⁹⁰ est confirmé par les deux doublets d'intégration 2 ($J=8.6$ Hz) à δ 6.83 et 7.88 ppm et le singulet d'intégration 3 à δ 2.53 ppm en RMN ^1H et un pic à δ 199.7 ppm caractéristique des cétones en ^{13}C .

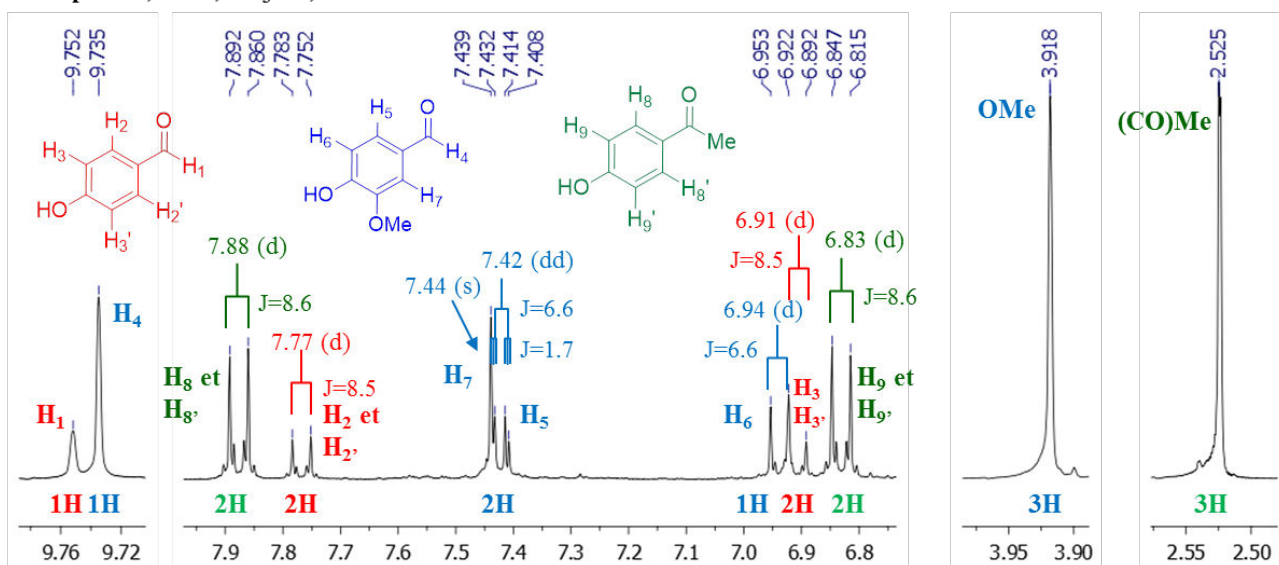
Composés 3, 5 et 6, CD_3OD , 270 MHz

Figure II-58. Spectre RMN ^1H (zones δ 2.50-2.55, 3.90-3.95, 6.8-7.9 et 9.72-9.76 ppm) des composés **3**, **5** et **6** (270 MHz, CD_3OD , δ_{TMS} 0 ppm)

Les composés **3**, **5** et **6** ont donc les structures suivantes (Figure II-59).

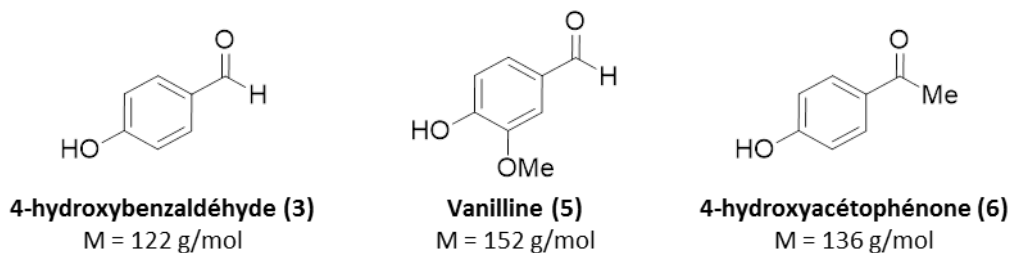


Figure II-59. Structures des 4-hydroxybenzaldéhyde (3), vanilline (5) et 4-hydroxyacétophénone (6)

Le composé **17**, dont le spectre UV (λ_{\max} 292, 330sh nm) est celui d'une flavanone ou d'un dihydroflavonol de masse molaire M= 272 g/mol. La RMN ^1H nous indique clairement la présence du motif dihydroflavonol (2 doublets avec $J=11.6$ Hz à δ 4.55 et 5.08 ppm). Le composé **17** est la pinobanksine^{51,63,74,182} (figure II-60).

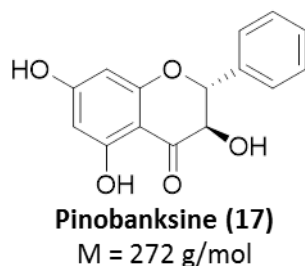
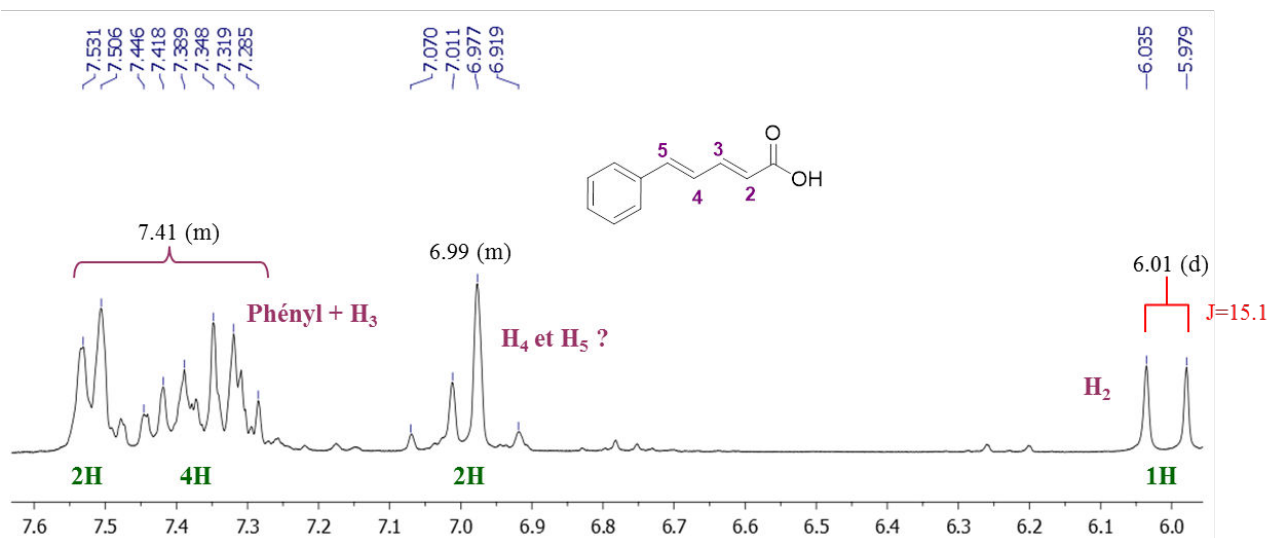


Figure II-60. Structure de la pinobanksine (17)

Le composé **25** présente en UV une bande d'absorption vers 312 nm. Avec une masse molaire de 174 g/mol et un temps de rétention de 20-21 min, ce composé n'est autre que l'acide cinnamylidène acétique, rencontré dans de nombreuses propolis^{31,51,63,191}. Mais il y a peu d'informations sur les spectres RMN de ce composé dans la littérature. Sanyal et Badami¹⁹² ont décrit, dans le spectre du proton, un seul multiplet intégrant pour 10 protons entre δ 6.35-7.80 ppm, ce qui est succinct. Ici, on distingue nettement un doublet ($J=15.1$ Hz) à δ 6.01 ppm (pouvant correspondre à H_1), mais seulement un multiplet à δ 6.99 ppm alors que l'on devrait voir deux doublets débouclés ($J=15$ et 10 Hz pour *trans* et *cis*) pour H_2 et H_3 (Figure II-61).

Composé 25, CD₃OD, 270 MHzFigure II-61. Spectre RMN ¹H (zone δ 5.9-7.6 ppm) du composé 25 (270 MHz, CD₃OD, δ_{TMS} 0 ppm)

En revanche, on peut davantage s'appuyer sur les données RMN ¹³C fournis par ces mêmes auteurs (8 signaux)¹⁹², afin de confirmer que le composé **25** est bien l'acide cinnamylidène acétique (Figure II-62).

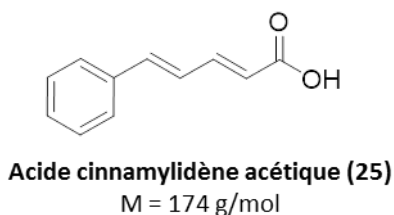


Figure II-62. Structure de l'acide cinnamylidène acétique (25)

Quant aux composés **39** et **40**, ils possèdent le même spectre UV (λ_{\max} 265-267, 364 nm) correspondant à un motif flavonol (type dérivé de la quercétine), et la même masse molaire M=300 g/mol. Ils n'ont pu être séparés de la chryisine, mais leur spectre RMN ¹H présente, en plus des signaux bien connus de cette dernière, des groupements méthoxyles à δ 3.90 et 3.93 ppm et des groupements hydroxyles en position 5 puisque leur signal est observé à δ 12.13 et 12.15 ppm dans l'acétone-*d*₆ (liaison hydrogène avec le carbonyle proche) (Figure II-63).

Composés 39 et 40, (CD₃)₂CO, 270 MHz

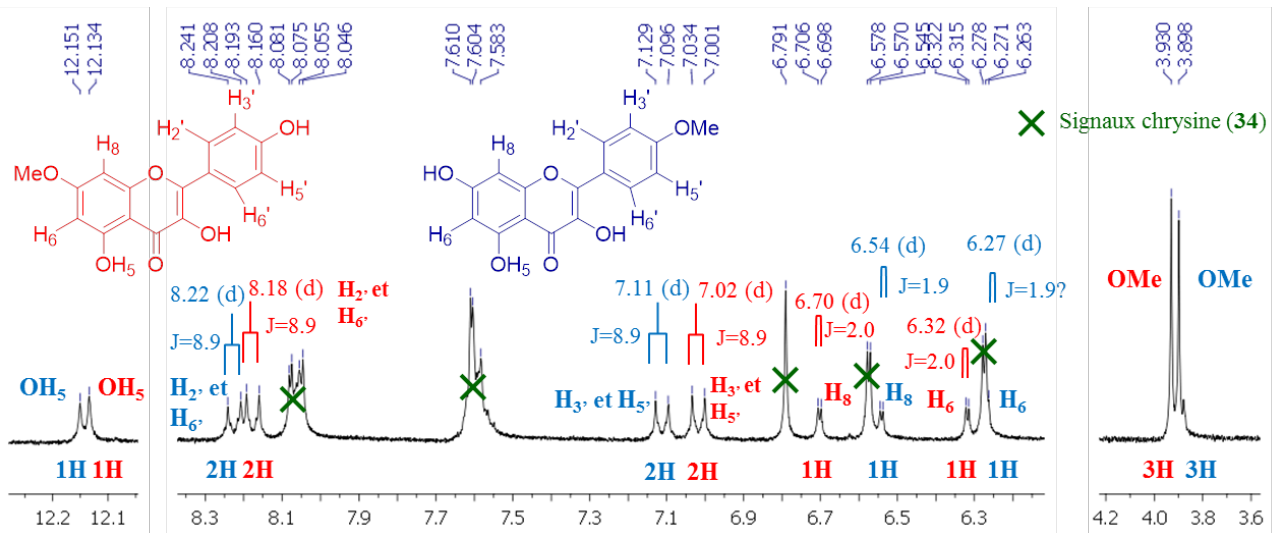


Figure II-63. Spectre RMN ¹H (zones δ 3.6-4.2, 6.2-8.3 et 12.1-12.2 ppm) des composés 39 et 40 (270 MHz, acétone-d₆, δ_{TMS} 0 ppm)

Le composé **39** est la rhamnocitrine^{32,193} et le composé **40**, le kaempféride¹⁹¹ (Figure II-64).

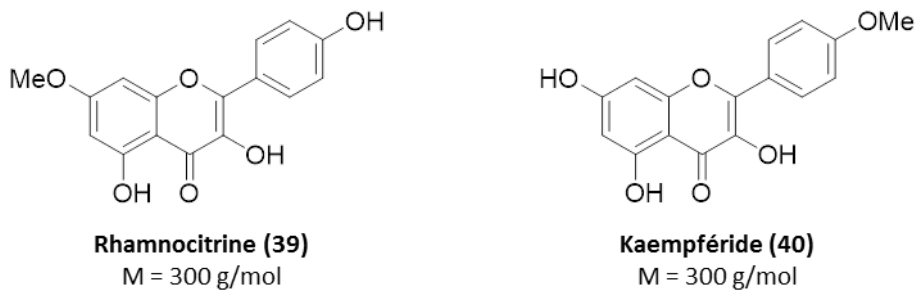


Figure II-64. Structures de la rhamnocitrine (39) et du kaempféride (40)

j) Fraction CF2-11 (composés 15, 18, 27, 33 et 42)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-11 sont regroupées sur la figure II-65.

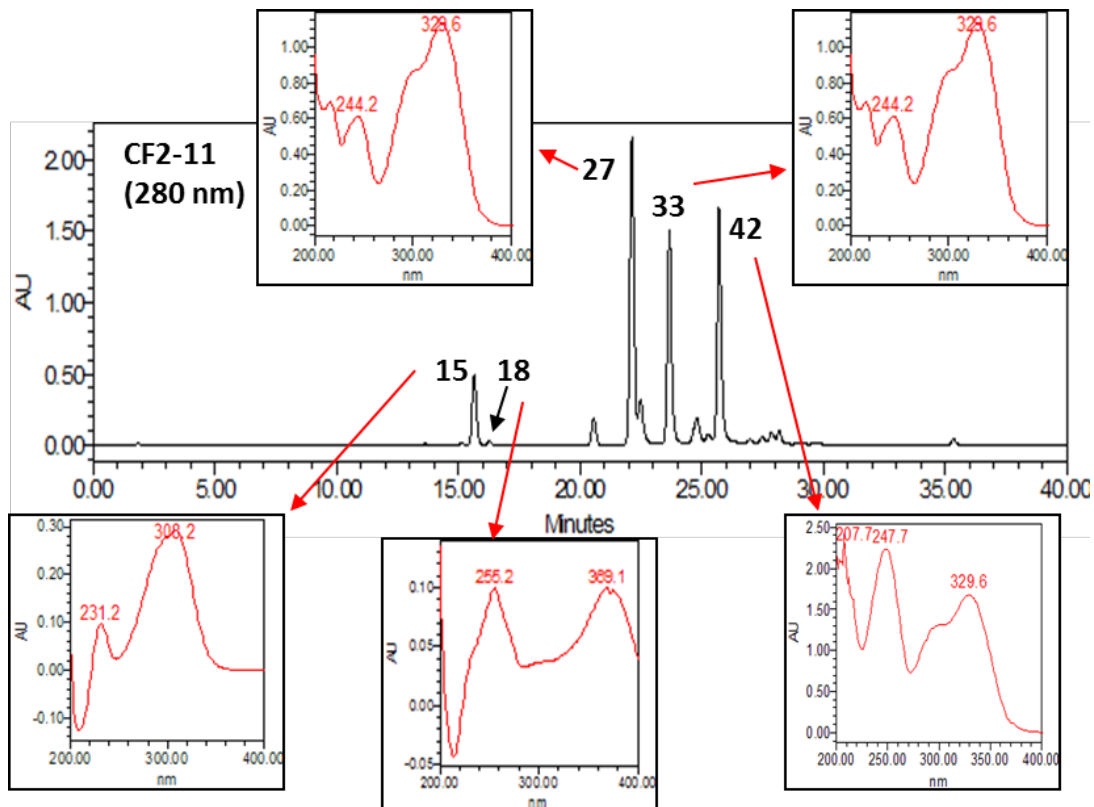


Figure II-65. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-11 et spectres UV des composés 15, 18, 27, 33 et 42

L'analyse ESI-MS donne les m/z suivants :

- Composé **15** : -MS : $[M-H]^-$ 177 soit $M=178$ g/mol
- Composé **18** : -MS : $[M-H]^-$ 301 soit $M=302$ g/mol
- Composé **27** : -MS : $[M-H]^-$ 269 ; $[2M-H]^-$ 539 soit $M=270$ g/mol
- Composé **33** : -MS : $[M-H]^-$ 283 ; $[2M-H]^-$ 567 soit $M=284$ g/mol
- Composé **42** : -MS : $[M-H]^-$ 295 ; $[2M-H]^-$ 591 soit $M=296$ g/mol.

Le composé **15** possède un spectre UV (λ_{\max} 308 nm) proche de celui de l'acide *p*-coumarique, avec une masse $M=164+14=178$ g/mol, c'est-à-dire avec un méthyle en plus par rapport à celui-ci. Il s'agit donc de l'acide 4-méthoxycinnamique^{44,74} (Figure II-66).

Le composé **18**, avec un spectre UV présentant des bandes d'absorption à 255 et 369 nm, et une masse molaire de 302 g/mol, est la quercétine^{51,63,71} (Figure II-66).

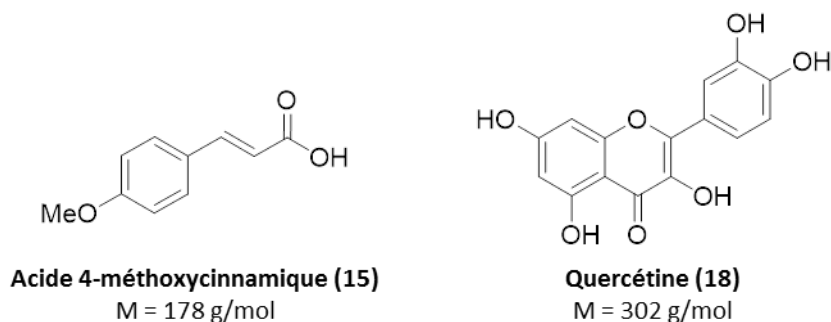


Figure II-66. Structures de l'acide 4-méthoxycinnamique (15) et de la quercétine (18)

La fraction CF2-11 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF10.CF2-11). Les composés **27**, **33** et **42** possèdent tous les trois un spectre UV (λ_{\max} 298, 330 nm) caractéristique des dérivés de l'acide caféique. Le spectre RMN ^1H du composé **27** indique la présence des motifs caféate (six signaux déjà décrits entre δ 6.2 et 7.6 ppm) et benzyle (singulet d'intégration 2 à δ 5.21 ppm et un multiplet d'intégration 5 à δ 7.35 ppm). Avec une masse de 270 g/mol, le composé **27** est le caféate de benzyle^{63,74,191,194} (Figure II-67). Quant au composé **33**, son spectre RMN ^1H présente également un motif caféate avec un groupement phényléthyle, caractérisé par 2 triplets ($J=7.0$ Hz) d'intégration 2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$) et un multiplet d'intégration 5 (phényl). Avec une masse molaire de 284 g/mol, le composé **33** est le caféate de phényléthyle (CAPE)^{51,63,74,191} (Figure II-67). Enfin, le spectre RMN ^1H du composé **42** indique cette fois-ci la présence d'un groupement cinnamyle en plus du motif caféate. Avec une masse molaire de 296 g/mol, le composé **42** est le caféate de cinnamyle^{44,51,63,191} (Figure II-67).

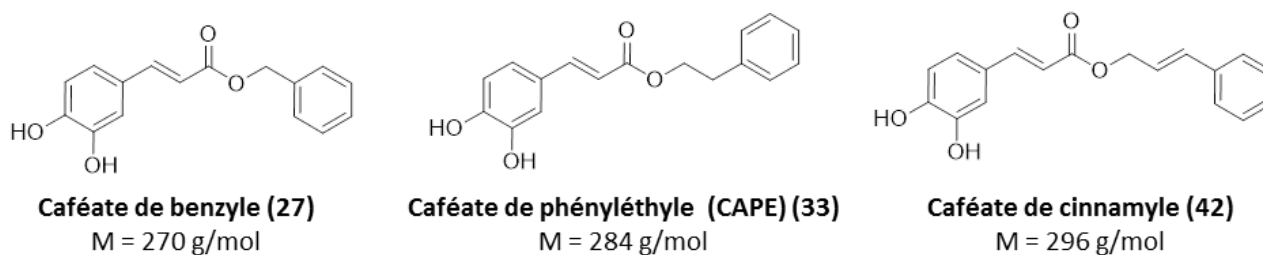


Figure II-67. Structures des caféates de benzyle (27), de phényléthyle (CAPE) (33) et de cinnamyle (42)

k) Fraction CF2-5 (composé 48)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-5 sont regroupées sur la figure II-68.

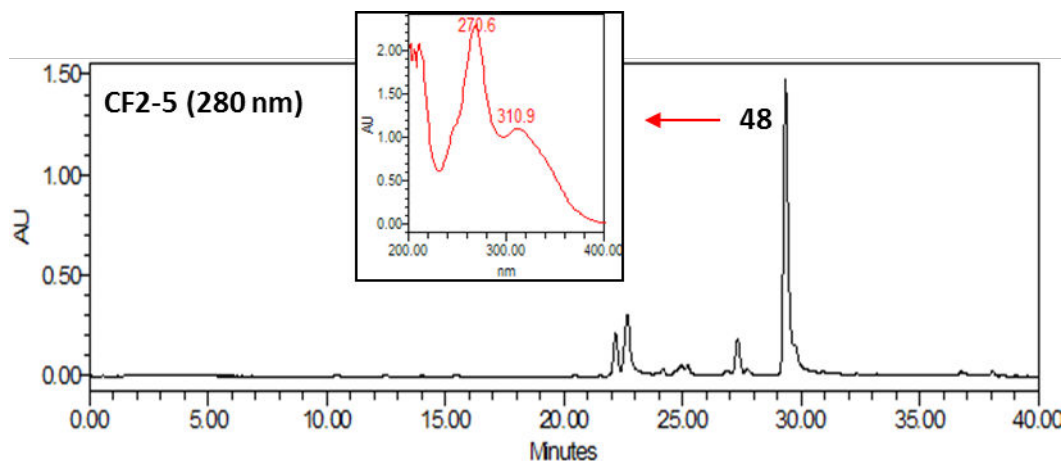
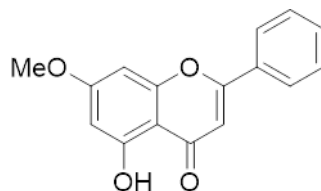


Figure II-68. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-5 et spectre UV du composé 48

L'analyse ESI-MS du composé **48** a révélé les m/z suivants :

+ MS : $[M+H]^+$ 269, $[M+Na]^+$ 291, $[2M+Na]^+$ 559 soit $M=268$ g/mol.

Le spectre UV (λ_{\max} 271, 311 nm) du composé **48** ressemble à celui de la chryisine et sa masse molaire pourrait correspondre à celle de la chryisine avec un méthyle en plus ($M=254+14=268$ g/mol). Le spectre RMN 1H confirme les signaux caractéristiques de la chryisine avec la présence d'un méthoxyle à δ 3.90 ppm. Le composé **48** est la tectochryisine^{31,51,74,195} (Figure II-69).



Tectochryisine (48)

$M = 268$ g/mol

Figure II-69. Structure de la tectochryisine (48)

I) Fraction CF2-4 (composé 46)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-4 sont regroupées sur la figure II-70.

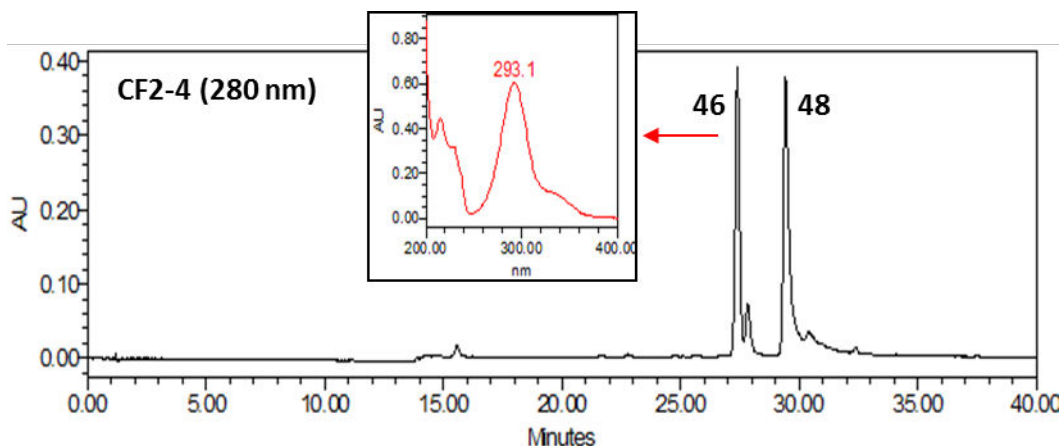


Figure II-70. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-4 et profil UV du composé 46

L'analyse ESI-MS du composé **46** donne les m/z suivants :

+ MS : $[M+H]^+$ 329, $[M+Na]^+$ 351, $[2M+Na]^+$ 679 soit $M=328$ g/mol.

Le spectre UV (λ_{max} 293, 330sh nm) est caractéristique de la famille des flavanones/dihydroflavonols. D'après le temps de rétention (27-28 min) et sa masse molaire de 328 g/mol, il pourrait s'agir de la pinobanksine-3-propanoate ou de l'alpinone-3-acétate^{31,63}. Dans cette fraction, on retrouve également la tectochrysin (**48**), étudiée dans la fraction précédente. Ainsi, le spectre RMN 1H de la fraction CF2-4 nous donne les signaux de la tectochrysin, que l'on peut soustraire, et ceux du composé **46**. On retrouve le motif dihydroflavonol (2 doublets à $J=11.6$ Hz à δ 5.37 et 5.82 ppm) et acétate (singulet d'intégration 3 à δ 2.04 ppm) que l'on a déjà rencontré dans la pinobanksine-3-acétate (**29**). De plus, on observe un méthoxyle à δ 3.83 ppm. L'analyse RMN étant réalisée dans le $CDCl_3$, on note la présence de l'hydroxyle en position 5 (singulet à δ 11.48 ppm). Le composé **46** est la 7-méthylpinobanksine-3-acétate, c'est-à-dire l'alpinone-3-acétate^{31,70,196} (Figure II-71).

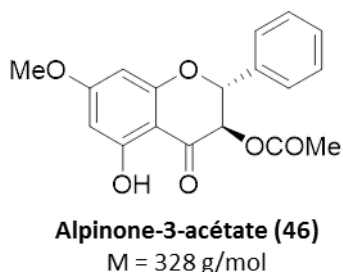


Figure II-71. Structure de l'alpinone-3-acétate (**46**)

m) Fraction CF2-1 (composés 49-52)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-1 sont regroupées sur la figure II-72.

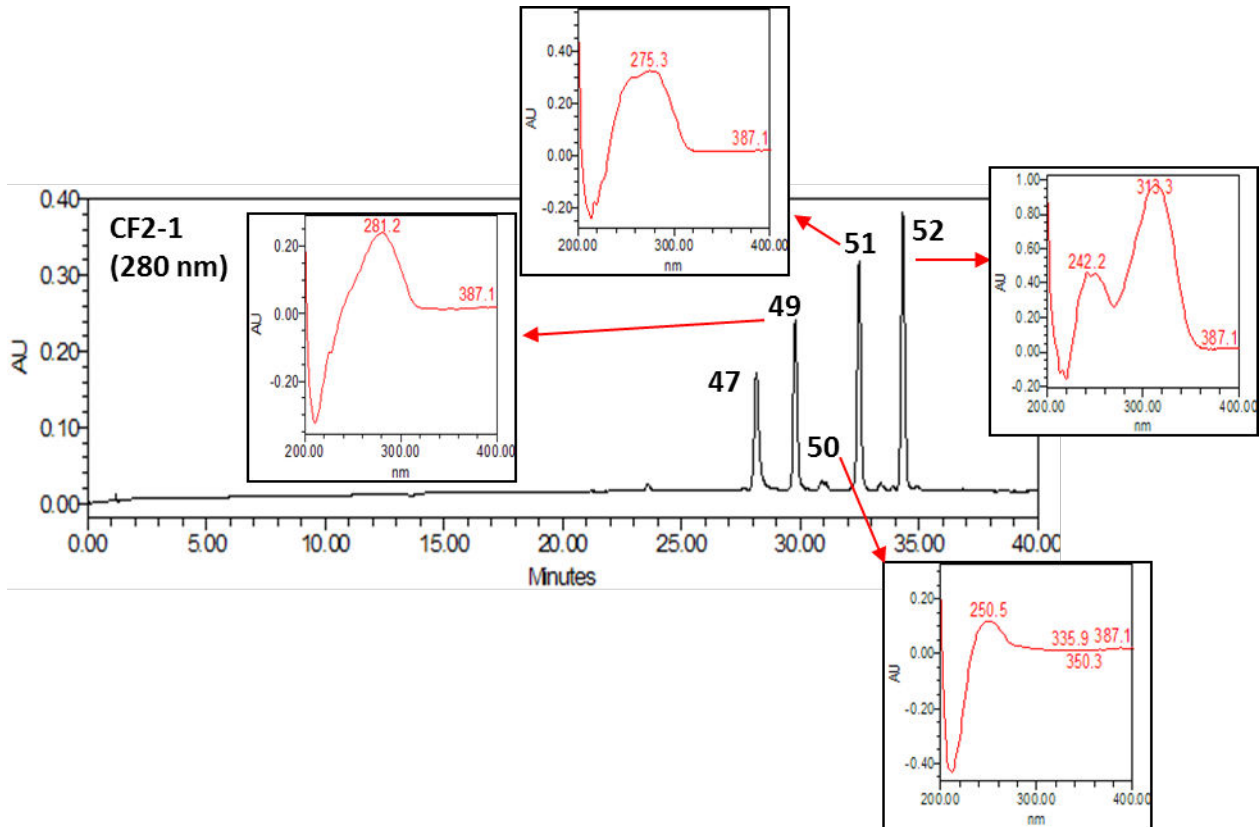


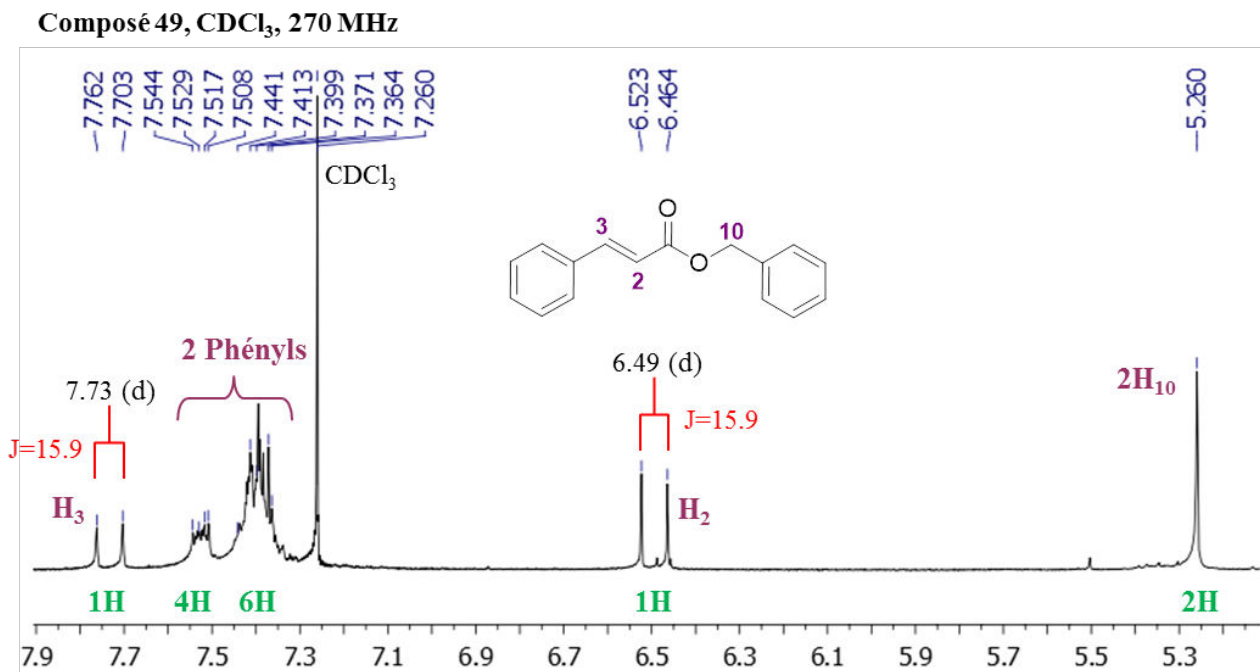
Figure II-72. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-1 et profils UV des composés 49-52

Le composé **47** a déjà été identifié comme étant la pinostrobine (CF2-2).

L'analyse ESI-MS a révélé les m/z suivants :

- Composé **49** : + MS : $[M+Na]^+$ 261 ; $[2M+Na]^+$ 499 soit $M=238$ g/mol
- Composé **50** : + MS : $[M+Na]^+$ 261 ; $[2M+Na]^+$ 499 soit $M=238$ g/mol
- Composé **51** : + MS : $[M+Na]^+$ 287 ; $[2M+Na]^+$ 551 soit $M=264$ g/mol
- Composé **52** : + MS : $[M+Na]^+$ 313 ; $[2M+Na]^+$ 603 soit $M=290$ g/mol.

La fraction CF2-1 a été purifiée par chromatographie Flash en phase normale (CF11.CF2-1). Le spectre UV (λ_{\max} 281 nm) du composé **49** est proche de celui de l'acide cinnamique et son spectre RMN 1H nous indique la présence de deux motifs phényles, d'une double liaison *trans* et d'un CH_2 déblindé (Figure II-73).



En se référant également à son temps de rétention (29-30 min), le composé **49** est donc le cinnamate de benzyle^{31,197} (Figure II-74).

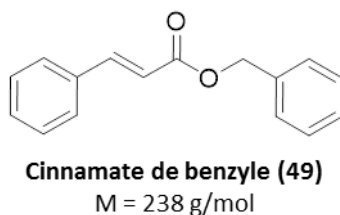


Figure II-74. Structure du cinnamate de benzyle (49)

Le composé **50** possède la même masse molaire (M = 238 g/mol) que le composé précédemment identifié. Son spectre RMN ¹H indique cette fois-ci la présence d'un groupement cinnamyle. Le composé **50** est le benzoate de cinnamyle^{31,198} (Figure II-75).

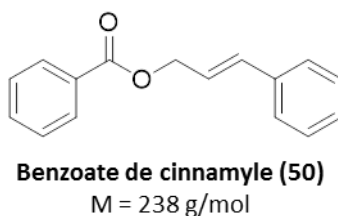
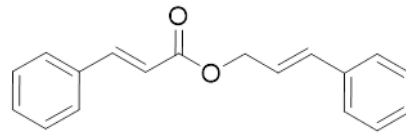


Figure II-75. Structure du benzoate de cinnamyle (50)

Le composé **51** n'a pu être isolé. Mais avec une masse molaire M = 264 g/mol (soit 26 uma de plus que les deux composés précédents pouvant correspondre à -CH=CH-) et tenant compte de

spectre UV proche de celui du cinnamate de benzyle (**49**) mais avec une bande plus large, le composé **51** est le cinnamate de cinnamyle³¹ (Figure II-76).



Cinnamate de cinnamyle (51)
M = 264 g/mol

Figure II-76. Structure du cinnamate de cinnamyle (51)

Le composé **52** possède un spectre UV (λ_{\max} 313 nm) proche de celui de l'acide cinnamylidène acétique. Le spectre RMN ¹H nous confirme la présence du motif cinnamylidène acétique et nous indique également celle d'un groupement cinnamyle (Figure II-77).

Composé 52, CDCl₃, 270 MHz

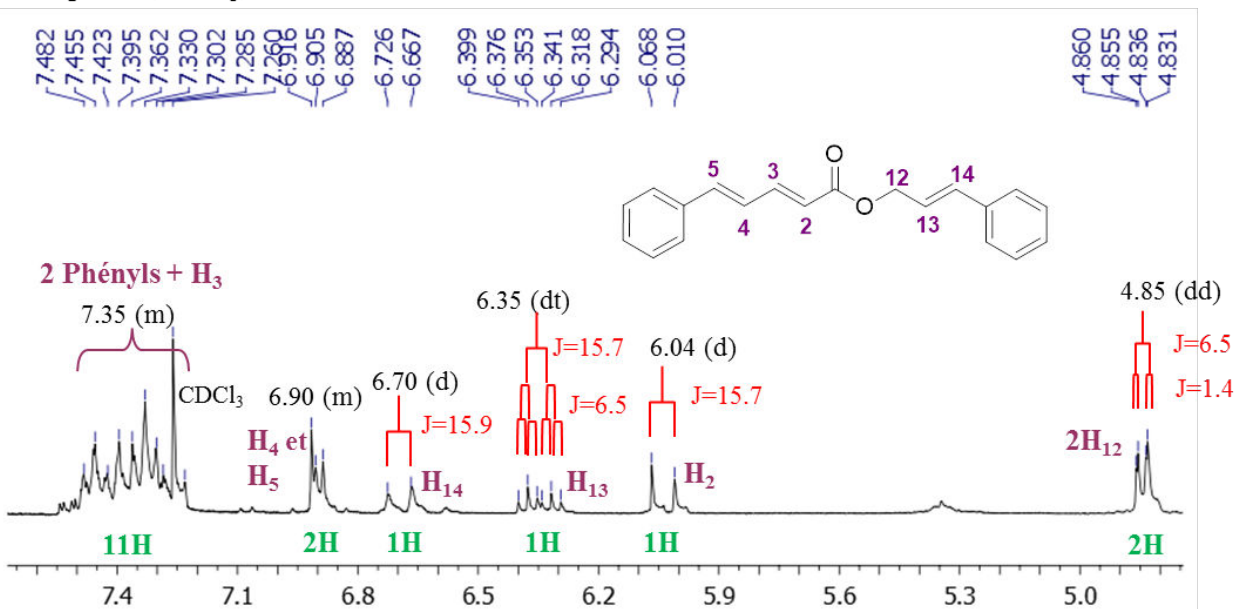
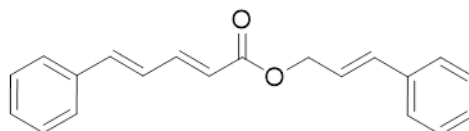


Figure II-77. Spectre RMN ¹H (δ zone 4.8-7.6 ppm) du composé 52 (270 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} 0 ppm)

Ainsi, en tenant également compte de sa masse molaire (M=290 g/mol), le composé **52** est le cinnamylidène acétate de cinnamyle, récemment identifié dans une propolis thaïlandaise par Athikomkulchai *et al.*⁷⁰ (Figure II-78).



Cinnamylidène acétate de cinnamyle (52)
M = 290 g/mol

Figure II-78. Structure du cinnamylidène acétate de cinnamyle (52)

n) Fraction CF2-20 (composés 20-22)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-20 sont regroupées sur la figure II-79.

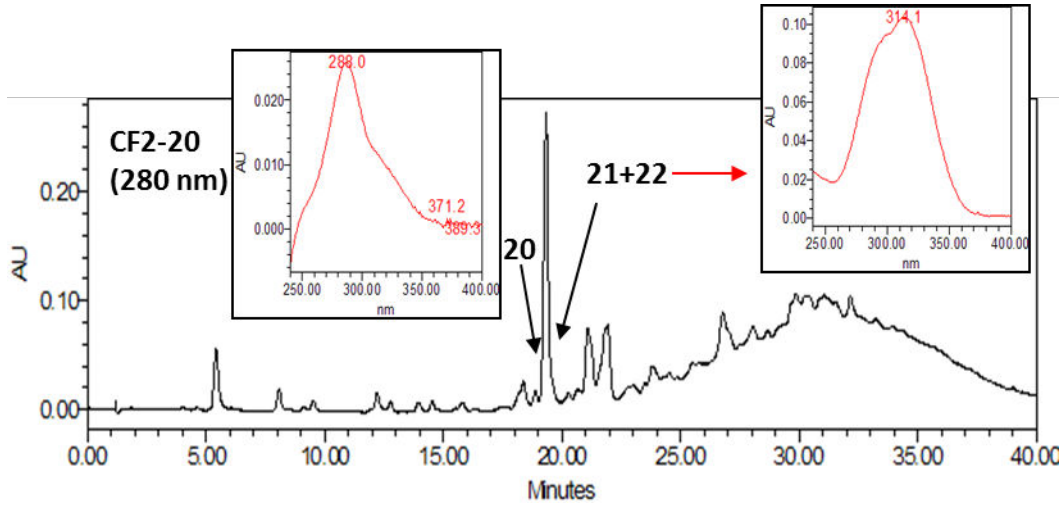
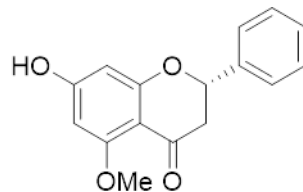


Figure II-79. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-20 et profils UV des composés 20-22

L'analyse MS donne les m/z suivants :

- Composé **20** : -MS : $[M-H]^-$ 269 ; $[2M-H]^-$ 539
+ MS : $[M+Na]^+$ 293 ; $[2M+Na]^+$ 563 soit $M=270$ g/mol
- Composé **21** : -MS : $[M-H]^-$ 383 soit $M=384$ g/mol
- Composé **22** : -MS : $[M-H]^-$ 413 ; + MS : $[M+Na]^+$ 437 soit $M=414$ g/mol.

La fraction CF2-20 a été purifiée par chromatographie Flash en phase inverse (CF12.CF2-20). Le composé **20** possède un spectre UV (λ_{max} 288, 330sh nm) caractéristique des flavanones/dihydroflavonols. Son spectre RMN 1H nous indique la présence d'un motif flavanone (3 dd à δ 2.72, 3.00 et 5.43 ppm) et un méthoxyle à δ 3.83 ppm. En tenant compte de sa masse molaire ($M=270$ g/mol), il pourrait s'agir de la 5 ou 7-méthylpinocembrine. Or la 7-méthylpinocembrine n'est autre que la pinostrobine (**47**), déjà identifiée, dont le temps de rétention est de l'ordre de 28 min. Ainsi, le composé **20**, est la 5-méthylpinocembrine¹⁹¹ (Figure II-80).



5-méthylpinocembrine (20)
 $M = 270$ g/mol

Figure II-80. Structure de la 5-méthylpinocembrine (20)

Les composés **21** et **22** n'ont pu être séparés et le spectre UV de l'ensemble présente une bande d'absorption à 314 nm, caractéristique des motifs p-coumaryles, avec toutefois un léger épaulement vers 295 nm. La RMN ^1H nous confirme la présence de motifs p-coumates mais également celle d'un motif férulate. En tenant compte des masses molaires assez élevées ($M = 384$ et 414 g/mol), le composé **21** a été identifié comme étant le 1,3-dicoumaroylglycérol^{199,200} et le composé **22** comme étant le 1-féruloyl-3-coumaroylglycérol^{199,201} (Figure II-81).

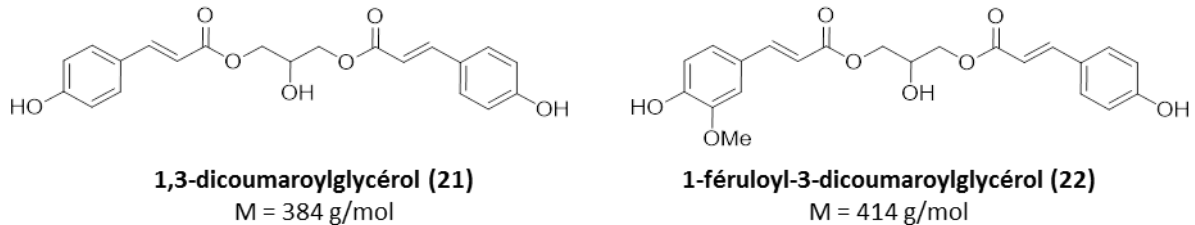


Figure II-81. Structures des 1,3-dicoumaroylglycérol (**21**) et 1-féruloyl-3-coumaroylglycérol (**22**)

o) Fraction CF2-15 (composé **24**)

Les données HPLC/UV de la fraction CF2-15 sont regroupées sur la figure II-82.

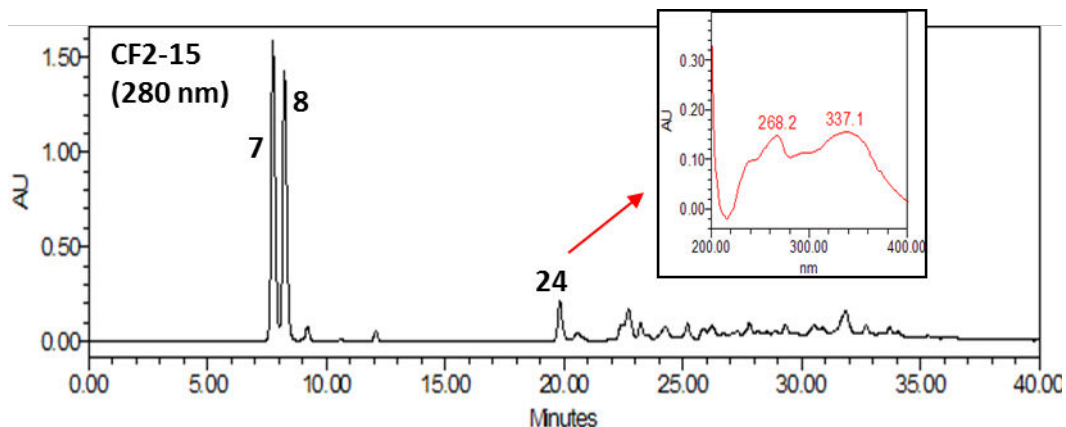


Figure II-82. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-15 et profil UV du composé **24**

Les composé **7** (acide p-coumarique) et **8** (acide férulique) ont déjà été identifié lors de l'étude déréplicative.

L'analyse ESI-MS du composé **24** a révélé les m/z suivants :

-MS : $[\text{M-H}]^-$ 269 ; $[2\text{M-H}]^-$ 539 soit $M = 270$ g/mol.

Compte tenu de son temps de rétention 19-20 min, de son profil UV (λ_{max} 268, 337 nm) et de sa masse molaire, le composé **24** est l'apigénine^{31,51,63,191} (Figure II-83).

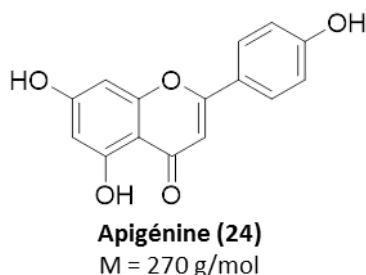


Figure II-83. Structure de l'apigénine (24)

p) Extrait DCM E09-2 (composés 19 et 23)

Après avoir identifié tous ces composés, il restait cependant une petite zone entre 18 et 21 min avec deux constituants non encore élucidés. Les données HPLC/UV de l'extrait total DCM (E09-2) dans la zone 18-21 min à 254 nm sont regroupées sur la figure II-84.

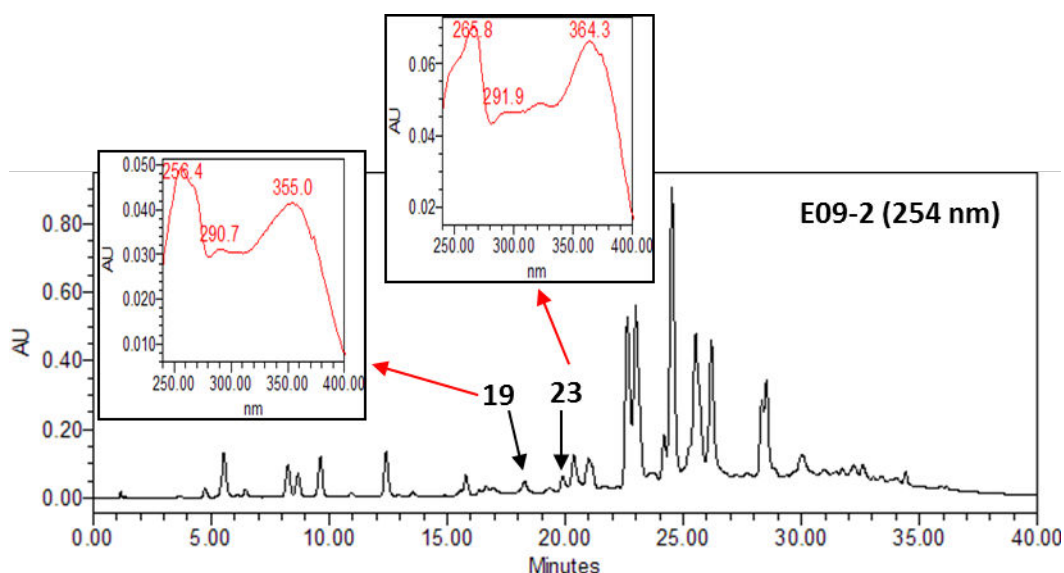


Figure II-84. Chromatogramme HPLC de l'extrait DCM E09-2 et profils UV des composés 19 et 23

L'analyse ESI-MS donne les m/z suivants :

- Composé **19** : -MS : $[M-H]^-$ 315 ;
+ MS : $[M+H]^+$ 317 ; $[M+Na]^+$ 339 soit M=316 g/mol
- Composé **23** : -MS : $[M-H]^-$ 285 soit M=286 g/mol.

Les composés **19** et **23** sont respectivement la 3-méthylquercétine^{19,38} et le kaempférol^{63,191} (Figure II-85).

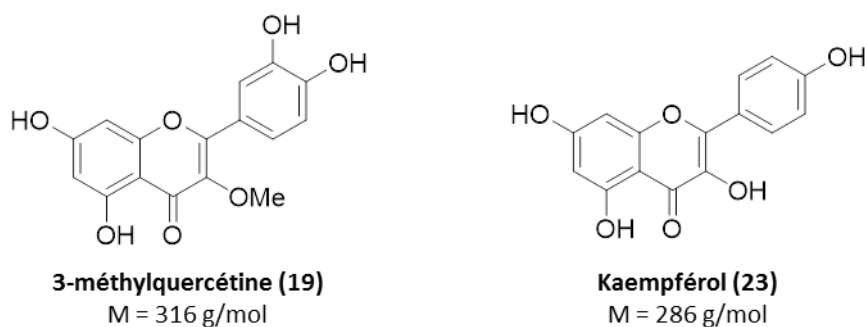


Figure II-85. Structures des 3-méthylquercétine (19) et kaempférol (23)

Abordons à présent la description des composés nouveaux.

5.2.2. Composés nouveaux

a) Composé 41 : dérivé de la pinocembrine

Le composé **41** est issu de la fraction CF2-13 (cf. section 5.2.1.f page 72). Les données HPLC/UV sont regroupées sur la figure II-86.

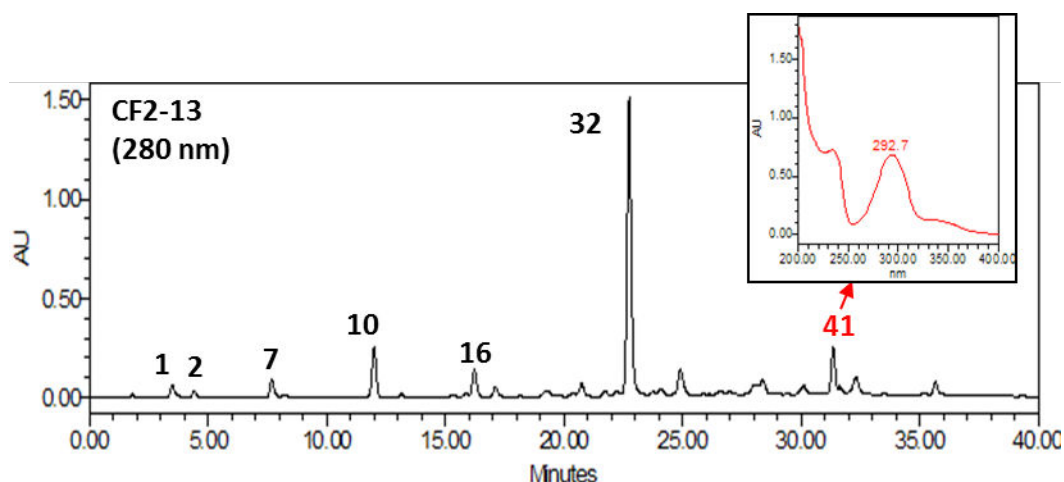


Figure II-86. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-13 et profil UV du composé 41

Le composé **41** possède un spectre UV (λ_{\max} 293, 340sh nm) caractéristique des flavanones/dihydroflavonols et l'analyse ESI-MS donne les m/z suivants :

-MS : $[M-H]^-$ 403 ; $[2M-H]^-$ 807

+MS : $[M+H]^+$ 405 ; $[M+Na]^+$ 427 soit M= 404 g/mol.

La chromatographie Flash en phase inverse (CF7.CF2-13) avait permis d'obtenir le composé **41** avec une pureté HPLC de 86.4% (max plot). Cette fraction avait alors été analysée en RMN 2D dans MeOD puis avait été purifiée à nouveau par HPLC préparative pour donner 2 mg de composé pur, mais celui-ci semblait s'être un peu dégradé après plusieurs heures passées dans le solvant

(H₂O/MeOH). L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS) donne une valeur expérimentale: [M-H]⁻ = 401.1027 pour une masse calculée de 403.1187. Conservé dans MeOH le composé s'est donc probablement dégradé. La structure a tout de même pu être mise en évidence en recoupant les spectres RMN ¹H (dans le méthanol-*d*4 et l'acétone-*d*6), RMN ¹³C, COSY (¹H-¹H), HMQC (¹H-¹³C), HMBC (corrélations ¹H-¹³C) et NOESY (proximité ¹H-¹H) avant (dans le méthanol-*d*4) et après (dans l'acétone-*d*6) la purification par HPLC préparative.

Le spectre RMN ¹H (dans CD₃OD) indique la présence d'un motif flavanone à δ 2.76 (1H, dd, *J* = 17.0, 3.2 Hz, H_{3b}), 3.09 (1H, dd, *J* = 17.0, 12.7 Hz, H_{3a}) et 5.44 ppm (1H, dd, *J* = 12.7, 3.2 Hz, H₂) et des protons aromatiques résonnant entre δ 5.99 et 7.50 ppm (Figure II-87). L'ensemble des spectres RMN du composé 41 est consultable dans l'annexe 4 page 351.

Composé 41, CD₃OD, 270 MHz

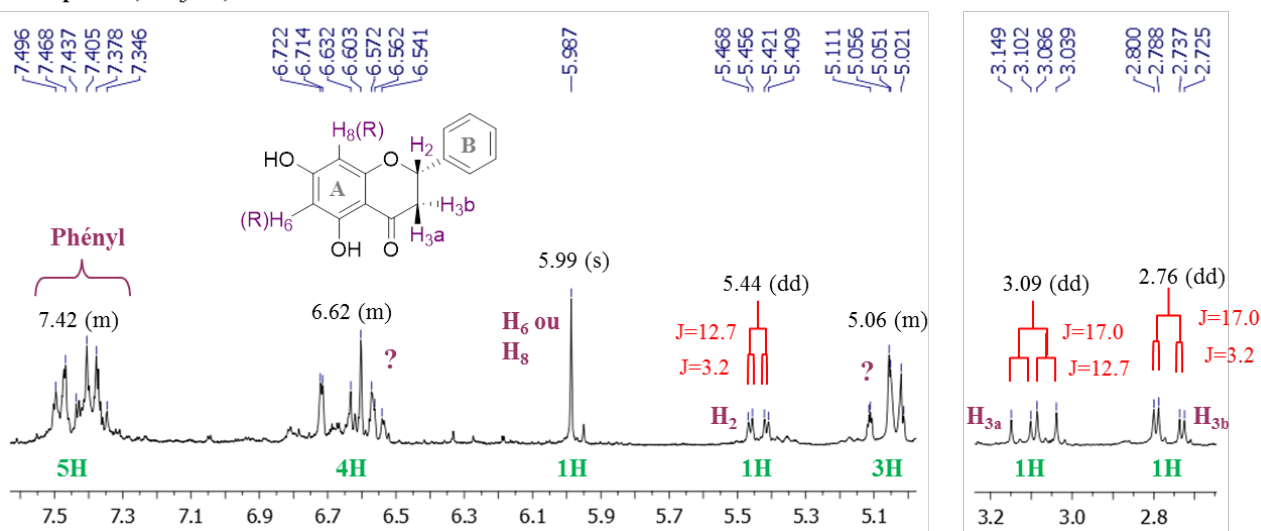


Figure II-87. Spectre RMN ¹H (zones δ 2.7-3.2 et 5.0-7.6 ppm) du composé 41 (270 MHz, CD₃OD, δ_{TMS} 0 ppm)

Le singulet à δ 5.99 ppm (1H) indique que le cycle A est pentasubstitué. Le multiplet à δ 7.42 ppm (5H) montre l'existence d'un groupement phényle. Les spectres RMN ¹³C and HMQC indiquent la présence de 24 carbones et confirment les signaux caractéristiques du motif flavanone à δ 44.4 (C₃) et 80.5 ppm (C₂). Le composé 41 semble donc correspondre à une pinocembrine substituée en position 6 ou 8. Il reste deux groupes de signaux non élucidés (multiplets à δ 5.06 et 6.62 ppm) correspondant au groupement R de masse 404-255 = 149 uma.

L'enregistrement du spectre de RMN ¹H dans l'acétone-*d*6 permet de résoudre la structure fine des multiplets associés à ce groupement (Figure II-88).

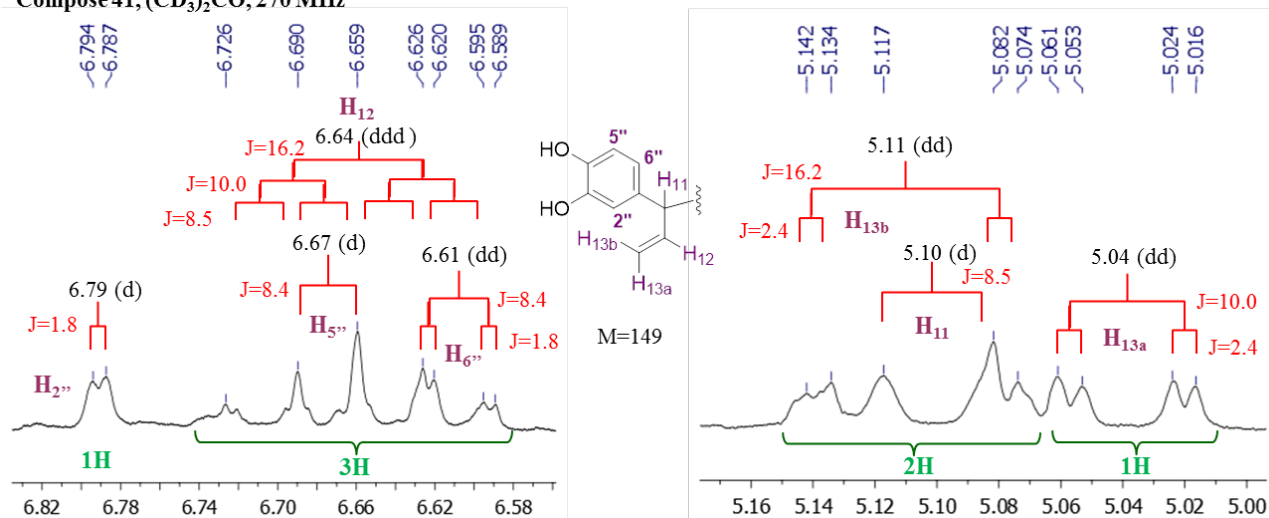
Composé 41, (CD₃)₂CO, 270 MHz

Figure II-88. Spectre RMN ¹H (zones δ 5.00-5.16 et 6.58-6.82 ppm) du composé 41 (270 MHz, acétone-d₆, δ_{TMS} 0 ppm)

Ainsi, dans ce solvant, il est possible de distinguer des signaux de protons allyliques à 5.04 (1H, dd, $J=10.0, 2.4$ Hz, H_{13a}), 5.10 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H₁₁), 5.11 (1H, dd, $J=16.2, 2.4$ Hz, H_{13b}) et 6.64 ppm (1H, ddd, $J=16.2, 10.0$ et 8.5 Hz, H₁₂), mais également les signaux d'un cycle benzénique 1'',3'',4''-trisubstitué (type dérivé acide caféique) à 6.61 (1H, dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, H_{6''}), 6.67 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H_{5''}) et 6.79 ppm (1H, d, $J=1.8$ Hz, H_{2''}).

Le spectre COSY montre des corrélations entre H₂, H_{3a} et H_{3b} d'une part, et entre H₁₁, H₁₂, H_{13a} et H_{13b} d'autre part. Le spectre HMBC indique des corrélations entre H₂ (δ_H 5.44) et le groupement phényle (cycle B), et des corrélations entre H₁₁ (δ_H 5.10) avec le cycle aromatique 1'',3'',4''-trisubstitué. Le groupement R est donc le 3'',4''-dihydroxyphénylallyle. Une corrélation longue distance entre OH₅ (δ_H 12.66 dans l'acétone-d₆) et C₆ (δ_C 112.3) indique que ce groupement est fixé sur la pinocembrine en position 6. Les données RMN ¹H et ¹³C (dans CD₃OD) et les corrélations 2D du composé 41 sont présentées respectivement dans le tableau II-4 et sur la figure II-89.

Un composé de structure voisine, la pinocembrine substituée en position 8 par un 3''-méthoxy-4''-hydroxyphénylallyle a été décrit par Athikomkulchai *et al.*⁷⁰ en 2013. Le composé 41 a été isolé en très faible quantité, et de plus, s'est révélé instable. Son pouvoir rotatoire n'a donc malheureusement pas pu être mesuré.

Tableau II-4. Données RMN ^1H et ^{13}C (dans CD_3OD) du composé 41

Composé 41					
Position	δ_{H} , mult (J in Hz)	δ_{C} , mult	Position	δ_{H} , mult (J in Hz)	δ_{C} , mult
2	5.44, dd (12.7, 3.2)	80.5, CH	1'		140.6, C
3	a 3.09, dd (17.0, 12.7)	44.4, CH_2	2'	7.32-7.52, m	127.4, CH
	b 2.76, dd (17.0, 3.2)		3'	7.32-7.52, m	129.8, CH
4		197.6, C	4'	7.32-7.52, m	129.7, CH
5		162.8, C	5'	7.32-7.52, m	129.8, CH
6		112.3, C	6'	7.32-7.52, m	127.4, CH
7		166.1, C	1''		136.5, C
8	5.99, s	95.9, CH	2''	6.79, d (1.8)*	116.0, CH
9		162.8, C	3''		145.6, C
10		103.3, C	4''		144.0, C
11	5.10, d (8.5)*	44.5, CH	5''	6.67, d (8.4)*	115.7, CH
12	6.64, ddd (16.2, 10.0, 8.5)*	141.2, CH	6''	6.61, dd (8.4, 1.8)*	119.9, CH
13	a 5.04, dd (10.0, 2.4)*	115.2, CH_2	OH-5	12.66, s*	
	b 5.11, dd (16.2, 2.4)*				

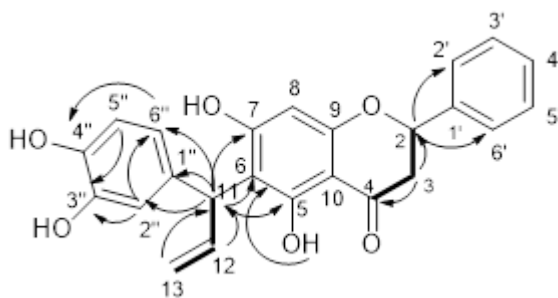
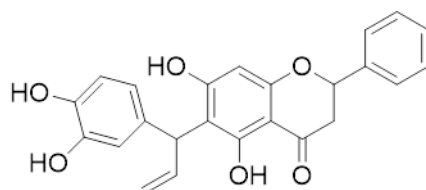
* δ_{H} et J dans $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ 

Figure II-89. Corrélations COSY (liaisons en gras) et HMBC (flèches) du composé 41

Le composé **41** a donc été identifié comme étant la 6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-èn-1-yl] pinoembrine (Figure II-90).



6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-èn-1-yl] pinoembrine (**41**)
M = 404 g/mol

Figure II-90. Structure de la 6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-èn-1-yl] pinoembrine (**41**)

b) Composé 43 : dérivé de la catéchine

Le composé **43** a été obtenu lors de la chromatographie Flash de la fraction CF2-18 en phase inverse (CF3.CF2-18). Les composés **9** et **13** avaient quant à eux déjà été identifiés dans la fraction CF2-19 (cf. section 5.2.1.c page 65). Les données HPLC/UV du composé **43** sont regroupées sur la figure II-91.

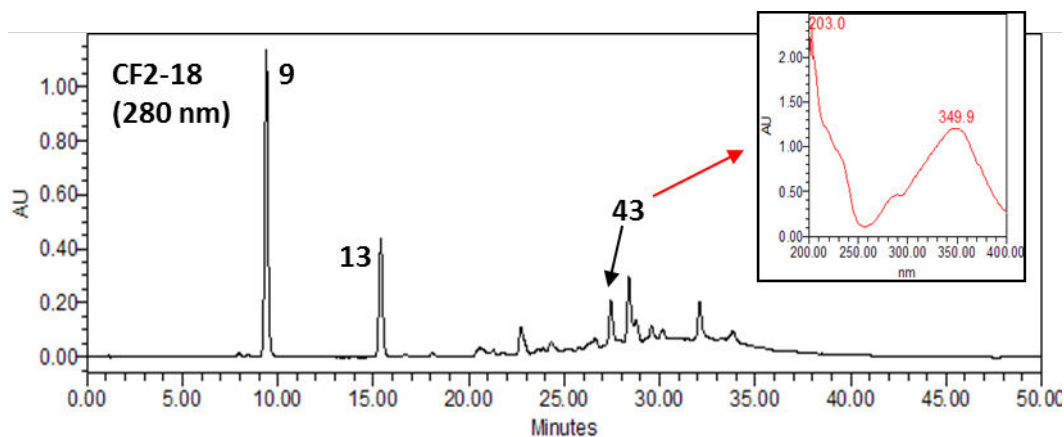


Figure II-91. Chromatogramme HPLC de la fraction CF2-18 et profil UV du composé 43

Le composé **43** est un solide de couleur jaune, il a simplement précipité dans quelques tubes et a été obtenu pur, après filtration, sans qu'il ne soit nécessaire de le purifier davantage (12.2 mg soit 0.6 µg/g de l'extrait DCM). Sa formule brute a été déterminée par HRESIMS comme étant $C_{25}H_{22}O_7$ avec une masse molaire de 434 g/mol ($[M+H]^+$ 435.1436; calculé 435.1438). Le spectre UV présente un maximum d'absorption à 350 nm. Le spectre IR présente une bande OH (3400 cm^{-1}) ainsi qu'une bande carbonyle de cétone conjuguée (1610 cm^{-1}). Le spectre RMN ^1H (réalisé dans l'acétone- d_6) indique la présence d'un motif flavan-3-ol à δ 2.53 (1H, dd, $J=16.2, 9.5\text{ Hz}$, H_{4b}), 3.07 (1H, dd, $J=16.2, 5.7\text{ Hz}$, H_{4a}), 4.21 (1H, m, H_3) et 4.68 ppm (1H, d, $J=8.9\text{ Hz}$, H_2), d'un méthoxyle à δ 3.92 ppm, de protons aromatiques entre δ 6.1 et 7.4 ppm (9H), de deux protons éthyléniques *trans* à δ 7.63 and 8.06 ppm (d, $J=15.7\text{ Hz}$) et d'un proton d'un hydroxyle proche d'un carbonyle (liaison H) à δ 14.49 ppm (Figure II-92). L'annexe 5 (page 355) rassemble tous les spectres RMN de ce composé.

Les spectres RMN ^{13}C et HMQC confirment la présence de 25 carbones et le motif flavan-3-ol à δ 30.6 (C_4), 66.8 (C_3) et 84.2 (C_2). Dans le spectre RMN ^1H , les signaux à δ 6.91 (1H, d, $J=8.4\text{ Hz}$), 6.96 (1H, dd, $J=8.4, 1.4\text{ Hz}$) et 7.11 (1H, d, $J=1.4\text{ Hz}$) suggèrent la présence d'un cycle B 1',3',4'-trisubstitué. Le singulet à δ 6.15 ppm (1H) indique que le cycle A est pentasubstitué. Le multiplet à δ 7.22 ppm (5H) révèle la présence d'un groupement phényle.

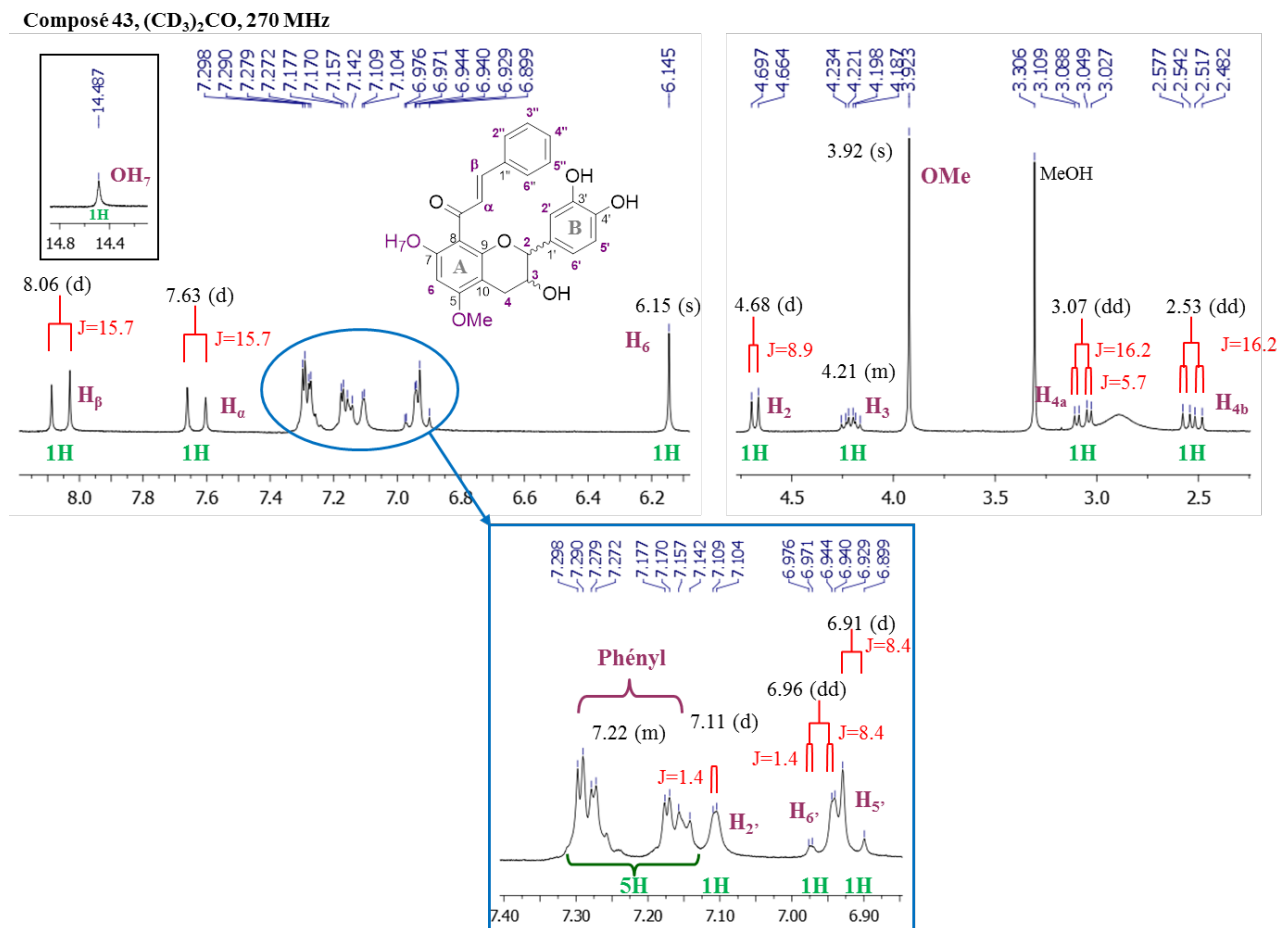
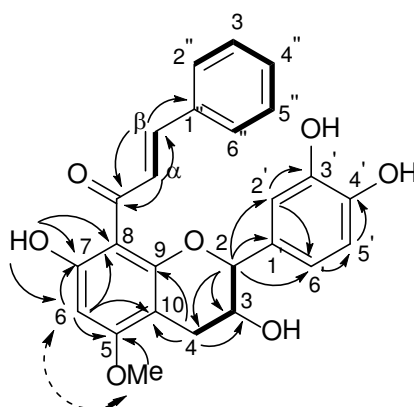


Figure II-92. Spectre RMN ¹H (zones δ 2.25-4.75 et 6.1-8.1 ppm) et agrandissement de la zone δ 6.80-7.40 du composé 43 (270 MHz, acétone-d₆, δ_{TMS} 0 ppm)

Le spectre HMBC montre une corrélation entre les deux protons éthyléniques *trans* à δ 7.63 et 8.06 ppm et le carbone de la cétone à δ 193.2 ppm. Cette corrélation nous indique donc la présence d'une cétone α,β-insaturée. Le proton éthylénique H_β à δ 8.06 ppm est aussi corrélé avec le carbone C_{1'} (δ 136.2 ppm) du groupement phényle. Cette corrélation nous permet de définir le motif (2E)-4-phénylprop-2-en-1-one. Une corrélation entre le méthoxy (δ_H 3.92) et le carbone à δ_C 165.1 (C₅) prouve que le OCH₃ est attaché au carbone C₅. Le spectre NOESY montre que ce méthoxy est spatialement proche du proton à δ 6.15 ppm (H₆), alors qu'une corrélation COSY longue-distance existe entre H₆ et l'hydroxyle à δ 14.49 ppm (OH₇). Ainsi, le groupement (2E)-4-phénylprop-2-en-1-one est localisé sur le carbone C₈ (δ_C 105.9). Enfin, en tenant compte de la masse molaire du composé 43, il s'avère que le cycle aromatique B est substitué en position 3' et 4' par deux hydroxyles. Les données RMN ¹H et ¹³C (dans l'acétone-d₆) et les corrélations 2D du composé 43 sont présentées respectivement dans le tableau II-5 et la figure II-93.

Tableau II-5. Données RMN ^1H et ^{13}C (dans l'acétone- d_6) du composé **43**

Composé 43					
Position	δ_{H} , mult (J in Hz)	δ_{C} , mult	Position	δ_{H} , mult (J in Hz)	δ_{C} , mult
2	4.68, d (8,9)	84.2, CH	1'		130.7, C
3	4.21, m	66.8, CH	2'	7.11, d (1.4)	116.2, CH
4	a 3.07, dd (16.2, 5.7)	30.6, CH ₂	3'		146.6, C
	b 2.53, dd (16.2, 9.5)		4'		146.2, C
5		165.1, C	5'	6.91, d (8.4)	116.0, CH
6	6.15, s	93.5, CH	6'	6.96, dd (8.4, 1.4)	121.3, CH
7		168.1, C	1''		136.2, C
8		105.9, C	2''	7.05-7.35, m	129.2, CH
9		157.6, C	3''	7.05-7.35, m	129.7, CH
10		102.4, C	4''	7.05-7.35, m	130.8, CH
α	7.63, d (15.7)	143.1, CH	5''	7.05-7.35, m	129.7, CH
β	8.06, d (15.7)	128.4, CH	6''	7.05-7.35, m	129.2, CH
C=O		193.2, C	OH-7	14.49, s	
			OCH ₃ -5	3.92, s	56.5, CH ₃

Figure II-93. Corrélations COSY (liaisons en gras), HMBC (flèches pleines) et NOESY (flèches en pointillés) du composé **43**

Sha *et al.*¹⁵⁹ ont identifié en 2009 un composé similaire qui diffère seulement du composé **43** par un cycle B 1',3',5'-trisubstitué. Le composé **43**, tout comme le composé identifié par Sha *et al.*, possède un pouvoir rotatoire nul ($[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 0$) (mesuré à 0.5 mg/mL dans l'acétone). Il a donc été isolé sous forme d'une paire d'énantiomères : la 8-[(E)-phénylprop-2-èn-1-one]-(2R,3S)-5-méthoxycatéchine (**43_a**) et la 8-[(E)-phénylprop-2-èn-1-one]-(2S,3R)-5-méthoxycatéchine (**43_b**) (Figure II-94).

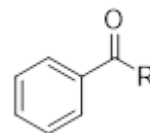
Les 51 composés identifiés sont répertoriés dans le tableau II-6 (les caractéristiques de chaque composé sont décrites dans l'annexe 3 page 325).

Tableau II-6. Composition chimique la propolis française de Ballot-Flurin

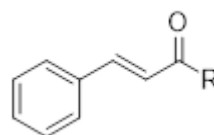
N°	Composé	N°	Composé
1	3,4-dihydroxybenzaldéhyde	27	Caféate de benzyle
2	Acide 4-hydroxybenzoïque	28	Caféate d'isopent-3-ènyle
3	4-hydroxybenzaldéhyde	29	Pinobanksine-3-acétate
4	Acide caféique	30	Caféate de prényle
5	Vanilline	31	2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol
6	4-hydroxyacétophénone	32	? Dérivé d'acide p-coumarique
7	Acide p-coumarique	33	Caféate de phényléthyle (CAPE)
8	Acide férulique	34	Chryisine
9	Acide isoférulique	35	p-coumarate de benzyle
10	Acide benzoïque	36	Galangine
11	Ac. 3,4-diméthoxycinnamique	37	Férulate de benzyle
12	Acide 3-phénylpropanoïque	38	Férulate de prényle
13	5-méthylpinobanksine	39	Rhamnocitrine
14	Acide cinnamique	40	Kaempféride
15	Acide 4-méthoxycinnamique	41	Phenylallyl pinocembrine (Nouveau)
16	Naringénine	42	Caféate de cinnamyle
17	Pinobanksine	43	Dérivé de la catéchine (Nouveau)
18	Quercétine	44	Isoférulate de cinnamyle
19	3-méthylquercétine	45	p-coumarate de cinnamyle
20	5-méthylpinocembrine	46	Alpinone-3-acétate
21	1,3-dicoumaroylglycérol	47	Pinostrobine
22	1-féuloyl-3-coumaroylglycérol	48	Tectochryisine
23	Kaempférol	49	Cinnamate de benzyle
24	Apigénine	50	Benzoate de cinnamyle
25	Acide cinnamylidène acétique	51	Cinnamate de cinnamyle
26	Pinocembrine	52	Cinnamylidène acétate de cinnamyle

Ces 51 molécules identifiées appartiennent à cinq familles de composés :

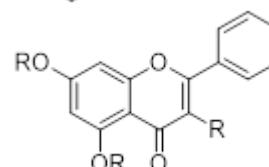
- *Dérivés du benzaldéhyde, de l'acide benzoïque et assimilés :*
7 molécules (composés **1, 2, 3, 5, 6, 10** et **50**)

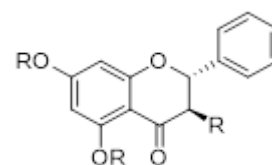
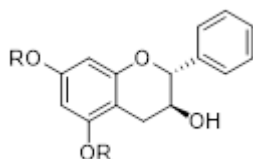


- *Dérivés des acides et esters cinnamiques et assimilés :*
25 molécules (composés **4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 21, 22, 25, 27, 28, 30, 31, 33, 35, 37, 38, 42, 44, 45, 49, 51** et **52**)



- *Flavones/flavonols :*
9 molécules (composés **18, 19, 23, 24, 34, 36, 39, 40** et **48**)



➤ *Flavanones/dihydroflavonols* :9 molécules (composés **13**, **16**, **17**, **20**, **26**, **29**, **41**, **46** et **47**)➤ *Flavan-3-ol* :1 molécule (composé **43**)

Ainsi, la propolis française de Ballot-Flurin, constituée de dérivés d'acides et d'esters cinnamiques, notamment les acides caféique, *p*-coumarique, férulique, isoférulique et leurs esters, et de flavonoïdes tels que la pinocembrine, la pinobanksine-3-acétate, la chrysin et tectochrysin, la galangine, la pinostrobine appartient-elle bien au type peuplier décrit par Bankova¹²² et validé par une étude de la composition chimique de bourgeons de peupliers (*Populus Nigra* L.) réalisée par Rubiolo *et al.* en 2013⁷⁴.

5.3. Quantification

Au sein de la cinquantaine de composés identifiés, certains, comme on vient de le voir, sont caractéristiques de la propolis de type peuplier. Parmi ceux-ci, douze marqueurs ont été choisis [les acides caféique (**4**), *p*-coumarique (**7**), férulique (**8**), isoférulique (**9**) et 3,4-diméthoxycinnamique (**11**) ainsi que la pinocembrine (**26**), la pinobanksine-3-acétate (**29**), le caféate de prényle (**30**), la chrysin (**34**), le CAPE (**33**), la galangine (**35**) et la pinostrobine (**47**)] pour être quantifiés de façon précise par HPLC/DAD dans plusieurs extraits. Ces marqueurs ont été sélectionnés d'une part parce qu'ils représentent les principales classes de métabolites secondaires caractéristiques de cette propolis (les acides et esters phénoliques, les flavanones, dihydroflavonols, flavones et flavonols) mais aussi en fonction de leur accessibilité (composés commerciaux à prix abordable ou composés majoritaires facilement isolables par exemple). Cette étude permettra alors d'analyser qualitativement et quantitativement de futurs extraits (aqueux et alcooliques) produits par l'entreprise afin de s'assurer de leur homogénéité et de proposer des extraits standardisés. Une estimation de la quantité des autres constituants de cette propolis a également été réalisée par gravimétrie et pureté HPLC.

5.3.1. Quantification des 12 marqueurs par HPLC/ DAD

a) Principe

Cette méthode consiste à analyser en HPLC/DAD les marqueurs choisis à différentes concentrations, puis d'établir les droites d'étalonnage en fonction des aires sous courbes mesurées. Les pics des différents composés ne doivent donc pas être coélus; ils doivent être suffisamment séparés pour une mesure correcte de l'aire sous courbe. Ce n'était pas le cas avec la méthode utilisée

précédemment (chromatogramme page 101 : méthode 1). Il a donc fallu optimiser cette dernière, de façon à séparer correctement les marqueurs.

b) Optimisation de la méthode HPLC

Plusieurs essais ont été réalisés afin d'optimiser cette méthode (modification de l'éluant, du gradient et du temps d'élution mais aussi augmentation du pourcentage d'acide²⁰²). Finalement, la méthode optimisée est basée sur celle décrite par Rubiolo *et al.*⁷⁴, utilisée pour l'étude de la composition des bourgeons de peupliers. Les chromatogrammes HPLC des extraits DCM (E04-2) et aqueux (E05-1) avec la méthode optimisée sont représentés sur la figure II-96.

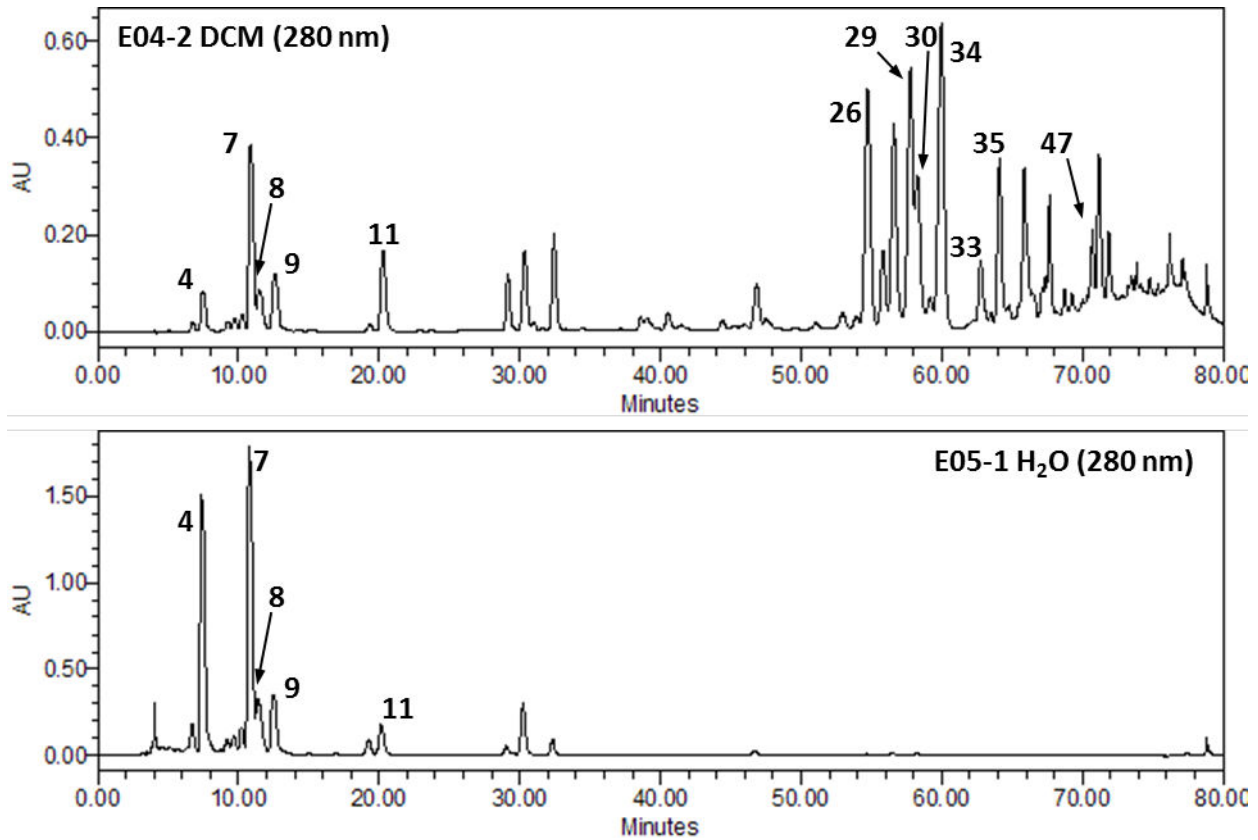


Figure II-96. Chromatogrammes HPLC à 280 nm des extraits DCM (E04-2) et aqueux (E05-1) (méthode optimisée : méthode 2) avec les douze marqueurs : 4 acide caféique, 7 acide p-coumarique, 8 acide férulique, 9 acide isoférulique, 11 acide 3,4-diméthoxycinnamique, 26 pinocembrine, 29 pinobanksine-3-acétate, 30 caféate de prényle, 34 chryisine, 33 CAPE, 35 galangine, 47 pinostrobine.

c) Quantification des douze marqueurs dans les extraits

Les douze marqueurs ont été quantifiés dans six extraits de propolis : les trois extraits alcooliques EtOH 70% (E01), MeOH (E02) et EtOH 96% (E03), l'extrait DCM (E04-2), l'extrait aqueux (E05-1), et l'extrait mixte (E08-2). Les analyses ont été réalisées en triplicat et les résultats sont rassemblés dans le tableau II-7.

Tableau II-7. Quantification des douze marqueurs dans six extraits de propolis

Marqueurs	E01	E02	E03	E04-2	E05-1	E08-2
	EtOH 70%	MeOH	EtOH 95%	DCM	Aqueux	mixte
Teneur (en mg/g d'extrait)						
Ac caféïque (4)	6.0 ± 0.1	6.6 ± 0.1	6.9 ± 0.1	5.0 ± 0.1	76.9 ± 0.6	8.0 ± 0.1
Ac <i>p</i> -coumarique (7)	11.1 ± 0.1	10.2 ± 0.1	10.7 ± 0.1	15.4 ± 0.1	61.4 ± 0.3	12.0 ± 0.1
Ac férulique (8)	4.4 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1	20.8 ± 0.4	4.2 ± 0.1
Ac isoférulique (9)	4.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.5 ± 0.1	6.5 ± 0.1	16.2 ± 0.2	4.6 ± 0.1
Ac 3,4-diméthoxy. (11)	7.7 ± 0.1	7.1 ± 0.1	7.7 ± 0.1	10.8 ± 0.1	9.9 ± 0.1	7.7 ± 0.1
Pinocembrine (26)	33.4 ± 0.2	33.0 ± 0.2	35.2 ± 0.2	49.6 ± 0.4	-	36.8 ± 0.3
Pinobanksine-3-ac (29)	38.7 ± 0.5	38.1 ± 0.2	40.2 ± 0.3	59.1 ± 0.5	-	42.8 ± 0.4
Caféate prényle (30)	20.2 ± 0.3	19.5 ± 0.2	20.2 ± 0.5	27.4 ± 0.3	-	22.0 ± 0.4
Chryisine (34)	23.5 ± 0.2	23.1 ± 0.2	24.7 ± 0.1	36.5 ± 0.4	-	27.6 ± 0.2
CAPE (33)	10.6 ± 0.2	10.4 ± 0.4	11.2 ± 0.2	15.8 ± 0.7	-	11.8 ± 0.2
Galangine (35)	20.7 ± 0.3	20.4 ± 0.5	21.9 ± 0.2	31.1 ± 0.8	-	23.5 ± 0.4
Pinostrobin (47)	12.9 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.7 ± 0.1	8.1 ± 0.4	-	7.8 ± 0.3
Total	193.7 ± 1.8	186.5 ± 1.8	195.3 ± 1.1	271.6 ± 3.5	185.3 ± 1.5	208.9 ± 2.4

Comme déjà souligné lors de l'étude des profils chromatographiques des différents extraits, l'extrait aqueux contient majoritairement des acides phénoliques et notamment les acides caféïque (4) et *p*-coumarique (7) avec respectivement 77 et 61 mg/g. Dans les autres extraits dits organiques, la pinobanksine-3-acétate (29) est toujours majoritaire, suivie de la pinocembrine (26), la chryisine (34), la galangine (35) et le caféate de prényle (30). L'extrait DCM est celui qui obtient la meilleure teneur cumulée en 12 marqueurs à savoir 272 mg/g, alors que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour l'extrait aqueux et MeOH (185 et 186 mg/g). Mais pour l'extrait aqueux, la teneur cumulée est calculée sur uniquement cinq marqueurs détectés.

Les mêmes trois premiers composés majoritaires ont été retrouvés dans plusieurs propolis d'origines géographiques très différentes. Kumazawa *et al.*⁵¹ ont ainsi montré que dans des propolis originaires de Chine (Hebei, Hubei et Zhenjiang) ou de Hongrie, la chryisine apparaissait largement majoritaire devant la pinocembrine et la pinobanksine-3-acétate alors qu'en Uruguay, la pinobanksine-3-acétate devançait la chryisine et la pinocembrine.

5.3.2. Quantification des autres constituants de l'extrait DCM

La quantification des composés, autres que les douze marqueurs quantifiés précédemment par HPLC, a été évaluée en fonction de la masse récupérée après purification (partielle ou complète) et des puretés HPLC (mesurées au "max plot" *i.e.* somme des longueurs d'onde) des différentes fractions issues des chromatographies Flash. Les teneurs estimées des 52 composés sont ainsi rassemblées dans le tableau II-8.

Tableau II-8. Teneur (en mg/ g) des 52 composés identifiés dans la propolis française étudiée

N°	Composé	Teneur (mg/ g)	N°	Composé	Teneur (mg/ g)
1	3,4-dihydroxybenzaldéhyde	traces ^a	27	Caféate de benzyle	9.6 ^b
2	Acide 4-hydroxybenzoïque	traces ^a	28	Caféate d'isopent-3-ényle	19.9 ^b
3	4-hydroxybenzaldéhyde	0.2 ^b	29	Pinobanksine-3-acétate	59.1^c
4	Acide caféique	5.0^c	30	Caféate de prényle	27.4^c
5	Vanilline	0.4 ^b	31	2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol	17.3 ^b
6	4-hydroxyacétophénone	0.4 ^b	32	? Dérivé d'acide <i>p</i> -coumarique	0.4 ^{b?}
7	Acide <i>p</i>-coumarique	15.4^c	33	Caféate de phényléthyle (CAPE)	15.8^c
8	Acide férulique	6.2^c	34	Chryisine	36.5^c
9	Acide isoférulique	6.5^c	35	<i>p</i> -coumarate de benzyle	17.9 ^b
10	Acide benzoïque	3.3 ^b	36	Galangine	31.1^b
11	Ac. 3,4-diméthoxycinnamique	10.8^c	37	Férulate de benzyle	1.1 ^b
12	Acide 3-phénylpropanoïque	traces ^a	38	Férulate de prényle	1.1 ^b
13	5-méthylpinobanksine	3.0 ^b	39	Rhamnocitrine	traces ^a
14	Acide cinnamique	1.7 ^b	40	Kaempféride	traces ^a
15	Acide 4-méthoxycinnamique	3.6 ^b	41	Phenylallyl pinocembrine	0.3 ^b
16	Naringénine	0.4 ^b	42	Caféate de cinnamyle	8.3 ^b
17	Pinobanksine	5.0 ^b	43	Dérivé de la catéchine	0.6 ^b
18	Quercétine	traces ^a	44	Isoférulate de cinnamyle	3.4 ^b
19	3-méthylquercétine	traces ^a	45	<i>p</i> -coumarate de cinnamyle	8.3 ^b
20	5-méthylpinocembrine	traces ^a	46	Alpinone-3-acétate	8.2 ^b
21	1,3-dicoumaroylglycérol	traces ^a	47	Pinostrobin	8.1^c
22	1-féruloyl-3-coumaroylglycérol	traces ^a	48	Tectochryisine	9.1 ^b
23	Kaempférol	traces ^a	49	Cinnamate de benzyle	2.6 ^b
24	Apigénine	traces ^a	50	Benzoate de cinnamyle	1.4 ^b
25	Acide cinnamylidène acétique	2.0 ^b	51	Cinnamate de cinnamyle	3.9 ^b
26	Pinocembrine	49.6^c	52	Cinnamylidène acétate de cinnamyle	2.4 ^b

^a d'après identification HPLC/DAD/MS (en très faible quantité), ^b d'après gravimétrie et puretés HPLC max plot, ^c d'après quantification HPLC/DAD

Parmi les 52 composés quantifiés, 12 sont présents à l'état de traces, 7 ont une teneur comprise entre 0.2 à 1.0 mg/g, 14 entre 1.1 et 5.0 mg/g et 19 ont une teneur supérieure à 5.1 mg/g. La teneur cumulée des 52 composés atteint donc environ 407 mg par gramme d'extrait, sachant que l'extrait contient notamment encore de la cire, et probablement d'autres classes de composés

chimiques tels que les acides aliphatiques, acides et esters gras, dérivés des sucres ou encore composés terpéniques⁴⁴ non identifiés ici.

Dans l'extrait DCM, la quantité des 12 marqueurs choisis s'étend de 5.0 mg/g pour l'acide caféique (**4**) jusqu'à 59.1 mg/g pour la pinobanksine-3-acétate (**29**), le composé majoritaire. D'autres composés, situés dans cette fourchette, tels que les caféates de benzyle (**27**, 9.6 mg/g) ou d'isopent-3-èneyle (**28**, 19.9 mg/g), le 2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol (**31**, 17.3 mg/g), le *p*-coumarate de benzyle (**35**, 17.9 mg/g) ou encore la tectochrysin (**48**, 9.1 mg/g) auraient également pu être choisis comme marqueurs, mais cela aurait engendré un trop grand nombre de composés "caractéristiques" à quantifier.

Parmi les 12 marqueurs choisis au départ, on remarque que cinq d'entre eux sont les composés majoritaires (**29**, **26**, **34**, **36** et **30**) contenus dans les extraits organiques. Le but étant aussi de quantifier les composés majoritaires contenus dans les extraits aqueux, le choix des dérivés d'acides cinnamiques (**4**, **7**, **8**, **9** et **11**) était donc également justifié (cf. tableau II-7 page 105). Le CAPE (**33**), même s'il ne fait pas partie des composés majoritaires, est un marqueur incontournable de la propolis de type peuplier³⁸. Enfin la pinostrobine (**47**), une flavanone moins polaire caractéristique également de ce type de propolis, a permis de compléter le registre de polarité des différents composés. Les 12 marqueurs sélectionnés permettent donc de caractériser rapidement, par HPLC, une propolis de type peuplier et leur quantification, d'évaluer les différences de qualité de divers échantillons de propolis. Dans un souci de simplification et de minimisation du coût, une sélection réduite, ne contenant que les sept composés les plus représentatifs, pourrait être proposée à l'entreprise Ballot-Flurin : l'acide caféique (1 acide phénolique), le caféate de prényle et le CAPE (2 esters phénoliques), la pinocembrine (1 flavanone), la pinobanksine-3-acétate (1 dihydroflavonol), la chrysin (1 flavone) et la galangine (1 flavonol).

6. Conclusion

La caractérisation chimique exhaustive de l'extrait DCM de propolis Ballot-Flurin a permis de mettre en évidence la présence de nombreux métabolites secondaires tels que des acides et esters phénoliques et des flavonoïdes caractéristiques des propolis de type peuplier. Parmi ces métabolites, deux nouvelles molécules ont été identifiées. La première, une flavanone, est un dérivé de la pinocembrine, la 6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-ène-1-yl]pinocembrine (**41**) et la deuxième, est un dérivé de la catéchine (flavan-3-ol), la 8-[(E)-phénylprop-2-ène-1-one]-5-méthoxycatéchine (**43**). Ces deux molécules pourraient-elles alors être reconnues en tant que marqueurs spécifiques de la propolis Ballot-Flurin ? **41** s'étant rapidement dégradé, seule la présence de **43** a pu être recherchée dans les 24 lots constituant le mélange initial de propolis Ballot-Flurin. Ce dérivé de la catéchine apparaissait dans 20 lots différents. **43** est donc bien présent dans une grande majorité de lots de

propolis issus du territoire français (étude confidentielle). Cette caractéristique ne se limite cependant pas à ce seul territoire puisque **43** est aussi présent dans une propolis italienne^{*}. A l'opposé, **43** est absent d'une propolis ivoirienne (cf. chapitre V) également, par son profil chimique, de type peuplier. Le composé **43** pourrait alors représenter un marqueur d'une région européenne. Des analyses HPLC/UV/MS complémentaires sur différents lots de propolis provenant d'Europe devront être réalisées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

7. Partie expérimentale

7.1. Réactifs et standards

Le réactif de Folin-Ciocalteu, le chlorure d'aluminium hexahydraté, l'acétate de potassium, la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNP), l'acide formique, l'acide gallique, la quercétine, la naringénine, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, l'acide isoférulique, l'acide 3,4-diméthoxycinnamique, le caféate de prényle, tous de pureté analytique, ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). L'acide caféique et la chrysin proviennent d'Acros Organics (Geel, Belgium). La galangine a été achetée chez Extrasynthèse (Genay, France) et le caféate de phényléthyle (CAPE) chez Tocris biosciences (Bristol, United Kingdom). La pinocembrine, la pinobanksin-3-acétate et la pinostrobine ont été isolées à partir de l'extrait DCM de propolis.

7.2. Instrumentation

Le pouvoir rotatoire a été mesuré à l'aide d'un polarimètre JASCO P-2000. La source monochromatique est la raie D du sodium et la cuve utilisée mesurait 5 cm.

Le spectre infrarouge (IR) a été enregistré sur un spectromètre Bruker Vertex 70.

Le spectromètre de masse couplé à l'HPLC est un appareil Bruker Esquire 3000+ composé d'un analyseur à trappe d'ions et équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) (cf. section 7.4.3). Les données ont été traitées avec le logiciel Data Analysis. Les analyses HRESIMS ont été réalisées sur un appareil Thermo Fisher Scientific LTQ-Orbitrap™.

Les expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectuées sur les appareils Jeol GSX à 270 MHz pour ¹H et 67.5 MHz pour ¹³C (spectres 1D) ou Bruker Avance à 500 MHz pour ¹H et 125 MHz pour ¹³C (spectres 1D et 2D) en utilisant le chloroforme-*d*, le méthanol-*d*₄, l'acétone-*d*₆ ou encore le DMSO-*d*₆. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et calibrés par rapport au solvant (pic de solvant non deutéré pour ¹H, signal dû au signal deutéré pour ¹³C) pris comme référence interne. Les constantes de couplage sont exprimées en hertz (Hz).

^{*} Résultats non présentés dans ce travail de thèse

Les absorbances (dosages spectrophotométriques) ont été mesurées à l'aide du lecteur de microplaques Tecan Infinite M200.

7.3. Extractions

7.3.1. Premières macérations alcooliques (E01 et E02)

Dans un erlenmeyer, 1g de propolis cryobroyée est additionné de 20 mL de solvant. Après 24h sous agitation magnétique (à température ambiante) ou 2h sous ultrasons (en essayant de maintenir la température entre 25 et 30°C à l'aide de glaçons), la solution est filtrée sous vide sur verre fritté (porosité 3). Le résidu est repris par 20 mL de solvant. Trois extractions successives sont réalisées de la sorte. Les trois filtrats sont rassemblés, puis évaporés sous pression réduite pour donner un extrait sec.

7.3.2. Macération éthanolique (EEP : E03)

Dans un erlenmeyer, 1g de propolis cryobroyée est additionné de 20 mL de solvant. Après 3x2h d'agitation, la solution est filtrée sous vide sur verre fritté (porosité 3). Les trois filtrats sont rassemblés, placés une nuit au congélateur à -18°C afin de faire précipiter les cires. Les cires sont alors filtrées à froid. Le filtrat final est évaporé sous pression réduite pour donner un extrait sec.

7.3.3. Extractions successives

a) Extraction par le cyclohexane (E04-1, E07-1, E08-1)

Dans un erlenmeyer, 1g de propolis cryobroyée est additionné de 20 mL de solvant. Après 3x2h, la solution est filtrée sous vide sur verre fritté (porosité 3). Les trois filtrats sont rassemblés, puis évaporés sous pression réduite pour donner un extrait sec. L'extrait obtenu est jaune et pâteux.

b) Extractions par le DCM (E04-2, E06-2, E07-3), AcOEt, MeOH (E04-3 et 4), EtOH 90% (E05-2), DCM/ MeOH/ H₂O (E08-2)

Le résidu issu de l'extraction précédente est repris dans 20 mL de solvant. Après 3x2h, la solution est filtrée sous vide sur verre fritté (porosité 3). Les trois filtrats sont rassemblés, puis évaporés sous pression réduite pour donner un extrait sec.

c) Extraction aqueuse (E05-1, E06-1, E07-2)

Dans un bécher, 1g de propolis cryobroyée est additionné de 20 mL d'eau Milli Q. L'ébullition est maintenue pendant 15 min, sous agitation magnétique, au moyen d'un bain de sable. Après refroidissement, la pellicule de cire est retirée et la solution est filtrée sous vide sur verre fritté (porosité 3). Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner un extrait sec.

7.4. Analyses HPLC

7.4.1. Préparation des échantillons

Les extraits secs sont dissous dans du MeOH qualité HPLC (10 mg/mL pour les extraits organiques et 5 mg/mL pour l'extrait aqueux) et centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min avant d'être placés dans des vials.

7.4.2. Analyses HPLC/ DAD (méthode 1)

Les échantillons (injection de 10 µL) sont analysés au moyen d'un module de séparation HPLC Waters 2695[®] équipé d'un détecteur à barrette de diodes Waters 2996[®], sur une colonne Lichrospher[®] 100 RP-18 (125x4 mm d.i., 5 µm) protégée par un cartouche de protection 4-4 Lichrocart[®] (4x4 mm d.i.), à un débit de 1 mL/min. La phase mobile est composée d'eau contenant 0.1% d'acide formique (solvant A) et de MeOH (solvant B). La séparation a été effectuée en utilisant le gradient linéaire suivant : de 25 à 100% de B en 40 min. La détection UV est réalisée sur une plage de longueurs d'onde allant de 200 à 400 nm. Les profils chromatographiques sont présentés à 280 nm.

7.4.3. Analyses HPLC/ UV/ MSⁿ

Les échantillons secs sont dissous dans le MeOH (10 mg pour les extraits et 5 mg pour les fractions) et analysés, selon la méthode 1, au moyen d'un module de séparation HPLC Waters 2795[®] équipé d'un détecteur à deux longueurs d'onde dual λ Waters 2487[®], couplés à un spectromètre de masse Bruker Esquire 3000+, composé d'un analyseur trappe d'ions avec une source d'ionisation électrospray (ESI) en modes positif et négatif, avec les conditions suivantes : gaz vecteur, He; amplitude d'énergie de collision, 1.3 V; gaz séchant et de nébulisation, N₂, 7 L/min; pression du gaz de nébulisation, 30 psi; température de séchage, 340°C; débit, 1.0 mL/min; ratio 1:9; plage de mesures m/z 100-1000.

7.5. Dosages spectrophotométriques

7.5.1. Polyphénols totaux

Le protocole utilisé est adapté de celui de Rebiai *et al.* (2011)³⁷. 20 µL d'extrait (à 2.5 mg/mL dans MeOH) sont mélangés avec 280 µL d'eau et 100 µL du réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange est agité pendant 3 minutes : la solution jaune (due au réactif de Folin-Ciocalteu) se colore progressivement en vert et ce d'autant plus que la concentration en composés phénoliques est élevée. Sont ajoutés ensuite 1200 µL d'eau et 400 µL de solution aqueuse Na₂CO₃ 20% : la solution basique de Na₂CO₃ 20% permet alors de neutraliser l'excès du réactif de Folin-Ciocalteu, un dégagement de CO₂ est observé et la solution devient bleue. Un blanc est réalisé de la même façon en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol. 200 µL de chaque solution sont placés dans les

puits d'une microplaque. L'absorbance est mesurée à 760 nm après 30 min à l'obscurité et à température ambiante au moyen du lecteur de microplaques TecanR Infinite M200. Le test est réalisé trois fois (n=3). Le standard utilisé pour réaliser la droite d'étalonnage est l'acide gallique (Figure II-97) car, bien qu'il ne soit pas présent en grande quantité dans la propolis, ce polyphénol est fréquemment utilisé lors de la détermination des taux de polyphénols totaux, permettant ainsi la comparaison avec d'autres propolis.

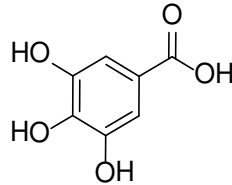


Figure II-97. Acide gallique

Des solutions filles d'acide gallique de concentrations 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 et 1.2 mg/mL dans MeOH, préparées à partir d'une solution mère à 5.0 mg/mL (réalisées en triple exemplaires), ont permis d'établir la droite d'étalonnage suivante avec un coefficient de détermination de 0.9941 (Figure II-98) :

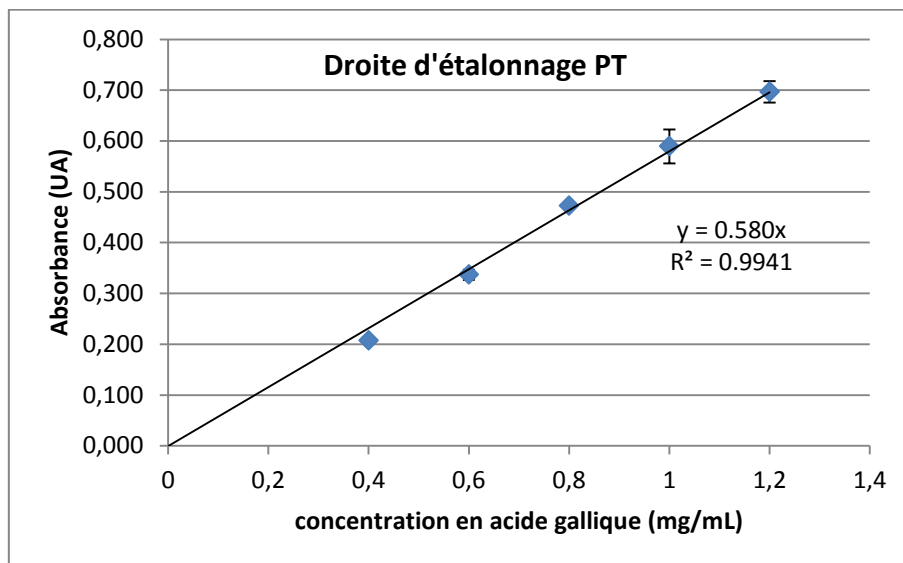


Figure II-98. Droite d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux

Les taux de PT des différents extraits sont calculés de la façon suivante :

$$\text{Taux de PT} = \frac{\text{Concentration de PT en GAE}}{\text{Concentration de l'extrait}} \times 1000$$

Où :

- ✚ Concentration de PT en GAE (Equivalent d'Acide Gallique) déduite à partir de l'absorbance de l'échantillon à l'aide de la droite d'étalonnage (en mg/mL)
- ✚ Concentration de l'extrait de propolis (mg/mL)

Les taux de PT sont donc exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g).

7.5.2. Flavones/ flavonols

Les taux de flavones/flavonols sont déterminés en appliquant la méthode de Woisky et Salatino⁴⁷ légèrement modifiée. 300 μL d'éthanol 95% sont mélangés avec 100 μL de la solution d'extrait (à 1.5 mg/mL dans l'éthanol 80%), puis sont ajoutés 20 μL d'une solution aqueuse de chlorure d'aluminium à 10%, 20 μL d'une solution aqueuse d'acétate de potassium 1M et 560 μL d'eau Milli Q. Après agitation, la solution se colore en jaune vif due à la formation du complexe stable entre les flavones/flavonols et AlCl_3 et d'autant plus que leur concentration est importante. 200 μL de chaque solution sont placés dans les puits d'une microplaque (dosage réalisé en triple exemplaire). La solution aqueuse de chlorure d'aluminium est remplacée par la même quantité d'eau Milli Q pour réaliser un blanc et ce, pour chaque solution d'extrait car il faut soustraire l'absorbance intrinsèque de l'extrait (le plus souvent de couleur jaune-orangée). Après 30 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 415 nm au moyen du lecteur de microplaques. Le standard utilisé ici est un flavonol, la quercétine (Figure II-99).

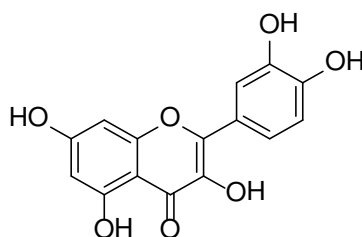


Figure II-99. Quercétine (18)

Des solutions de quercétine de concentrations 25, 50, 100, 150 et 200 $\mu\text{g/mL}$ ont été réalisées (en triple exemplaire) afin d'établir la droite d'étalonnage avec un coefficient de détermination de 0.9988 (Figure II-100).

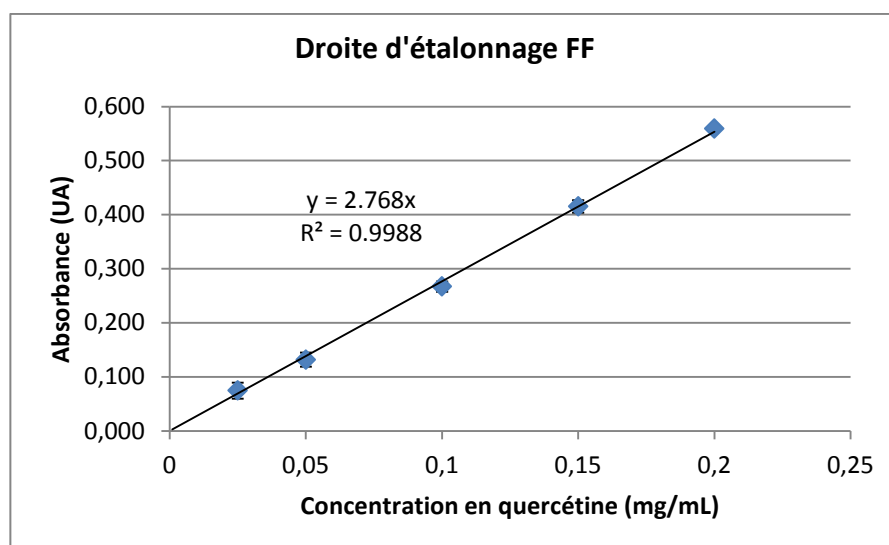


Figure II-100. Droite d'étalonnage du dosage des flavones/ flavonols

Les taux de FF, exprimés en milligrammes d'Equivalent Quercétine par gramme d'extrait (mg QE/g), sont calculés de la même façon que pour les taux de PT :

$$\text{Taux de FF} = \frac{\text{Concentration de FF en QE}}{\text{Concentration de l'extrait}} \times 1000$$

Où :

- ✚ Concentration de FF en QE (Equivalent de Quercétine) déduite à partir de l'absorbance de l'échantillon à l'aide de la droite d'étalonnage (en mg/mL)
- ✚ Concentration de l'extrait de propolis (mg/mL)

7.5.3. Flavanones/ dihydroflavonols

La méthode de Nagy et Grancai⁴⁸ utilisée pour doser les flavanones et dihydroflavonols présents dans les extraits de propolis a été quelque peu modifiée. 200 μL de la solution d'extrait (à 2.5 mg/mL dans le méthanol), dilués avec 100 μL de méthanol réagissent avec 200 μL d'une solution acide méthanolique de DNP (500 mg de DNP mélangés avec 1 mL d'acide sulfurique 96% et dilués jusqu'à 50 mL avec du méthanol) à 50°C pendant 50 min. La solution de couleur jaune (due à la DNP acide) passe progressivement à l'orangé et ce d'autant plus que la concentration en FD est élevée. Après refroidissement à température ambiante, 400 μL de ce mélange sont collectés et mélangés avec 400 μL d'une solution d'hydroxyde de potassium 20% dans l'éthanol 70%. La solution basique a pour but de neutraliser l'hydrazone protonée formée ainsi que l'excès de DNP, cette dernière sous forme basique étant très peu soluble dans MeOH. Il se forme alors un précipité et la solution se colore en marron foncé. Le précipité formé est ensuite éliminé par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min. 40 μL du surnageant sont alors mélangés à 360 μL d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium 1% (de façon à s'assurer que le milieu reste basique) puis 200 μL de chaque solution sont déposés dans les puits de la microplaque. Un blanc unique est préparé de la même façon en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol. L'absorbance est mesurée à 495 nm au moyen du lecteur de microplaques. Le standard utilisé pour ce dosage est une flavanone, la naringénine (Figure II-101).

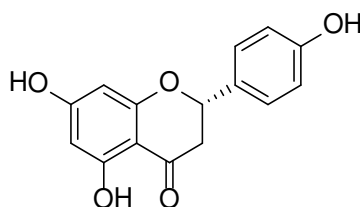


Figure II-101. Naringénine (16)

Des solutions de naringénine à 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 et 2.00 mg/mL dans MeOH ont permis la construction de la droite d'étalonnage avec un coefficient de détermination de 0.9999 (Figure II-102).

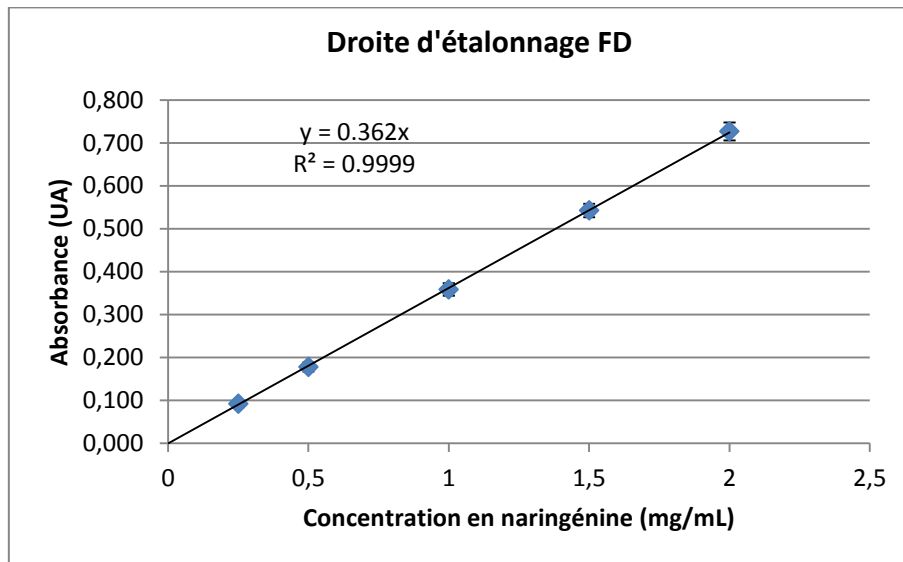


Figure II-102. Droite d'étalonnage du dosage des flavanones/ dihydroflavonols

Les taux de FD, exprimés en milligrammes d'Equivalent Naringénine par gramme d'extrait (mg NE/g), sont calculés de la façon suivante :

$$\text{Taux de FD} = \frac{\text{Concentration de FD en NE}}{\text{Concentration de l'extrait}} \times 1000$$

Où :

- ✚ Concentration de FD en NE (Equivalent de Naringénine) déduite à partir de l'absorbance de l'échantillon à l'aide de la droite d'étalonnage (en mg/mL)
- ✚ Concentration de l'extrait de propolis (mg/mL)

7.6. Fractionnements et purifications

La technique de fractionnement choisie fut la chromatographie Flash. En effet, cette technique de chromatographie sur colonne (CC) sous pression permet de réduire le temps de fractionnement ainsi que la quantité de solvant utilisée par rapport à une colonne ouverte. Elle présente également l'avantage d'un fonctionnement automatisé en système fermé, donc plus sécuritaire. Après avoir réalisé plusieurs extraits par différents solvants, le choix de l'extraction à plus grande échelle s'est porté sur celle par le DCM (rendement de 50%) précédée de l'extraction cyclohexanique (comme E04-2 DCM).

7.6.1. Chromatographie Flash de l'extrait DCM (CF2)

a) Extraction dichlorométhanique de 50 g de propolis (E09)

50 g de propolis cryobroyée ont tout d'abord été extraits trois fois par 200 mL de cyclohexane pendant 2h afin d'éliminer le maximum de cires. Après filtration sous vide sur verre fritté, les filtrats ont été rassemblés et évaporés sous pression réduite pour donner 16.4 g d'extrait cyclohexanique

(32.8%). Le résidu a alors été repris quatre fois par 200 mL de DCM pendant 2h, puis encore deux fois par 100 mL de DCM pendant 1h afin de donner, après filtration, 25.0 g d'extrait DCM sec (rendement de 50.0%).

Un premier essai de fractionnement sur 3 g d'extrait DCM (CF1) a été réalisé en vue d'ajuster au mieux les conditions pour le fractionnement sur 21 g (CF2).

b) Préparation du dépôt solide

21 g d'extrait DCM ont été dissous dans 200 mL de DCM dans lesquels ont été ajoutés 42 g de gel de silice (extrait/silice: 1/2). Le mélange a été évaporé sous pression réduite jusqu'à obtention d'une poudre fine sèche.

c) Fractionnement

Le fractionnement a été réalisé sur un appareil CombiFlash Rf Teledyne ISCO avec une colonne de silice (Interchim PF-50SI HC/300g, 50 μ m, 20 bars) à un débit de 100 mL/min en utilisant le gradient de solvant suivant: cyclohexane (C_6H_{12}) 100% (2.0 L), C_6H_{12} :AcOEt 90:10 (1.7 L), C_6H_{12} :AcOEt 90:10 à 80:20 (2.2 L), C_6H_{12} :AcOEt 80:20 à 70:30 (2.5 L), C_6H_{12} :AcOEt 70:30 à 60:40 (2.2 L), C_6H_{12} :AcOEt 60:40 à 50:50 (3.0 L) puis DCM/MeOH 96:4 à 90:10 (3.0 L). 700 tubes de 25 mL ont été recueillis et rassemblés en 26 fractions (CF2-1 à 26) en tenant compte du chromatogramme obtenu aux deux longueurs d'onde choisies (254 et 280 nm) ainsi que des analyses CCM (éluants C_6H_{12} :AcOEt 60:40 et DCM/MeOH 96:4, détection UV λ 254 nm).

Les masses et pourcentages de chaque fraction, après évaporation du solvant, sont rassemblés dans le tableau II-9.

Tableau II-9. Masses et pourcentages de chaque fraction issue de l'extrait DCM E09-2 (21 g)

N°	Tubes ^a	Masse fraction (g)	fraction/extrait (%)	N°	Tubes ^a	Masse fraction (g)	fraction/extrait (%)
1	A4-14	2.143	10.2	14	F24-G14	1.422	6.8
2	A15-24	1.521	7.2	15	G15-22	0.159	0.7
3	A25-48	1.173	5.6	16	G23-40	0.339	1.6
4	A49-B6	0.696	3.3	17	G41-H5	0.543	2.6
5	B7-40	0.384	1.8	18	H6-23	0.558	2.6
6	B41-C8	1.596	7.6	19	H24-70	1.032	4.9
7	C9-40	1.775	8.5	20	I1-12	0.670	3.2
8	C41-63	1.298	6.2	21	I13-15	0.078	0.4
9	C64-D32	1.302	6.2	22	I16-22	2.027	9.7
10	D33-62	1.341	6.4	23	I23-59	0.030	0.1
11	D63-E25	1.120	5.3	24	I60-70	0.005	0.0
12	E26-F6	0.536	2.5	25	J1-52	0.151	0.7
13	F7-23	0.335	1.6	26	J53-70	0.021	0.1

^a Chaque lettre compte 70 tubes

Les masses des fractions obtenues varient de quelques milligrammes à quelques grammes. Les profils chromatographiques des 26 fractions, réalisés dans les mêmes conditions que pour l'extrait DCM, sont consultables dans l'annexe 6 page 359. Les fractions 1, 9, 11 par exemple contiennent de nombreux pics, les fractions 4, 8, 10, 14 seulement deux ou trois pics. Enfin, les fractions 2 et 17 semblent, quant à elles, ne contenir qu'un seul composé. De plus, on note que certains pics (par exemple vers 16-17 min et vers 22-23 min) sont présents dans des chromatogrammes, puis disparaissent et réapparaissent. Plusieurs composés semblaient ainsi coélus dans l'extrait total. Le fractionnement en phase normale a donc permis leur séparation. Il peut exister des différences au niveau des temps de rétention (jusqu'à 1 min) entre certains chromatogrammes. En effet, la méthode HPLC comprend un rinçage au MeOH ainsi qu'un retour aux conditions de départ afin de pouvoir enchaîner les analyses. Il s'est avéré qu'au début de la thèse, le temps qui était alloué au retour aux conditions initiales était un peu court, d'où certains décalages possibles.

7.6.2. Purifications des fractions par chromatographie Flash

Toutes les chromatographies Flash ont été réalisées sur l'appareil CombiFlash Rf Teledyne ISCO en dépôt solide (avec silice C18 1:1 ou 1:2) sur la même colonne en phase inverse (Interchim PF-30C18 HC/6g, 30 µm) et les mêmes éluants H₂O (A) et MeOH (B), excepté pour CF11 réalisée en phase normale.

a) CF3.CF2-18

500 mg de fraction CF2-18 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 40% B (7 min), 40-50% B (2 min), 50% B (30 min) et le débit de 20 mL/min. Les composés **9** et **13** n'ont pu être séparés. Cependant, les tubes 28-34 contenaient 12.2 mg du composé **43** (composé nouveau dérivé de la catéchine) qui a précipité.

b) CF4.CF2-19

500 mg de fraction CF2-19 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 25% B (25 min), 25-35% B (1 min), 35% B (20 min) et le débit de 15 mL/min. Les tubes 5-8 contenaient 8.0 mg d'acide isoférulique (**9**) et les tubes 20-22, 25.9 mg (pur à 97% selon HPLC max plot) de 5-méthylpinobanksine (**13**).

c) CF5.CF2-6

500 mg de fraction CF2-6 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 25-30% B (20 min), 30-40% B (2 min), 40% B (8 min), 40-45% B (1 min), 45% B (12 min), 45-50% B (2 min), 50% B (20 min) et le débit de 15 mL/min. Les tubes 4-7 contenaient 10.2 mg d'acide benzoïque (**10**). 17.4 mg de pinocembrine pure (**26**) ont été récupérés sous forme de précipité dans le tube 31 et 123.5 mg de pinocembrine pure à 88% ont été recueillis dans les tubes 24-30. Les tubes 36-37 contenaient également 14.5 mg d'un mélange 50/50 de férulates de benzyle et de prényle (**37** et **38**).

d) CF6.CF2-8

500 mg de fraction CF2-8 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 30-45% B (20 min), 45% B (30 min), 45-48% B (5 min), 48-55% B (5 min), 55% B (8 min), 55-60% B (1 min), 60%B (12 min) et le débit de 20 mL/min. Les tubes 6-8 contenaient 3.0 mg d'acide cinnamique (**14**). 20.3 mg de pinobanksine-3-acétate pure (**29**) ont été récupérés dans les tubes 28-30&34 et 226.5 mg de cette même pinobanksine-3-acétate mais pure seulement à 90% ont été recueillis dans les tubes 31-32 et 37-53. Enfin, les tubes 71-87 contenaient 27.9 mg d'isoférulate de cinnamyle (**44**).

e) CF7.CF2-13

300 mg de fraction CF2-13 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 30-45% B (20 min), 45% B (20 min), 45-50% B (10 min), 50-60% B (5 min), 60% B (5 min) et le débit de 15 mL/min. Les tubes 12-14 contenaient 1.4 mg d'acide 3,4-diméthoxycinnamique (**11**). 3.8 mg de naringénine (**16**) pure à 68% ont été récupérés dans les tubes 20-22. Le composé

32 non identifié (pur à 92%) a été recueilli dans les tubes 36-40 (10.1 mg) et le composé nouveau **41** (phénylallylpinoembrine) pur à 86% a été recueilli dans les tubes 60-63.

f) CF8.CF2-7

500 mg de fraction CF2-7 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 30-50% B (25 min), 50-60% B (25 min), 60-65% B (20 min) et le débit de 15 mL/min. Les tubes 11-13 contenaient moins d'un mg d'acide 3-phénylpropanoïque (**12**). 48.2 mg de *p*-coumarate de benzyle pur (**35**) ont été récupérés dans les tubes 44-46 (avec 29.7 mg de ce même *p*-coumarate de benzyle pur à 75% dans les tubes 58-62 et 82.2 mg pur à 70% dans les tubes 42-43 et 47-48). 19.2 mg de galangine (**36**) pure à 75% ont également été récupérés dans les tubes 53-54 (avec 92.3 mg en mélange dans les tubes 49-52 et 55-57). Enfin, les tubes 58-62 contenaient 54.9 mg de *p*-coumarate de cinnamyle (**45**) pur à 76%.

g) CF9.CF2-9

500 mg de fraction CF2-9 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 30-60% B (50 min), 60-65% B (5 min), et le débit de 17 mL/min. Les tubes 2-6 contenaient 8.0 mg d'un mélange 20/40/40 de 4-hydroxybenzaldéhyde (**3**), de vanilline (**5**) et de 4-hydroxyacétophénone (**6**). 32.7 mg de pinobanksine (**17**) pure à 95% ont été récupérés sous forme de précipité dans les tubes 20-29. 18.0 mg d'acide cinnamylidène acétique (**25**) pur à 85% ont également été récupérés dans les tubes 30-34. Plus de 150 mg de chrysine pure (**34**) ont été recueillis dans les tubes 76-82. Enfin, les tubes 47-53 contenaient 5.2 mg d'un mélange de rhamnocitrine et de kaempféride (**39** et **40**) (33% des 2 composés avec 67% de chrysine).

h) CF10.CF2-11

500 mg de fraction CF2-11 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 25-75% B (55 min) et le débit de 20 mL/min. Les tubes 16-18 contenaient 5.9 mg de caféate de benzyle pur (**27**), obtenus après filtration du précipité. 25.1 mg de ce même composé pur à 75% ont été recueillis dans le filtrat 16-18 en y ajoutant le tube 19), mais aussi 60.9 mg purs à 60% dans les tubes 20-24 et 46.7 mg en mélange à 44% dans les tubes 25-27). 19.9 mg de caféate de phényléthyle (CAPE) (**33**) pur seulement à 51% ont été récupérés dans les tubes 28-29, avec en complément 60.9 mg en mélange à 40% dans les tubes 20-24 et 46.7 mg en mélange à 47% dans les tubes 25-27. Enfin, 44.0 mg de caféate de cinnamyle (**42**) pur à 86% étaient contenus dans les tubes 37-41, ainsi que 51.8 mg purs à 63% dans les tubes 30-36.

i) CF11.CF2-1

La fraction CF2-1 (200 mg), étant peu polaire, a été chromatographiée en phase normale (dépôt solide avec de la silice 1:3), sur une colonne silice (Grace, 24g). Les solvants utilisés étaient le cyclohexane (A) et l'acétate d'éthyle (B) selon le gradient suivant : 1% B (30min), 2% B (5 min), 2-5% B (2 min), 5% B (2 min), 5-30% (1 min), 30% B (5 min) avec un débit de 25 mL/min. Les tubes 28-30 ont recueilli 2.7 mg de benzoate de cinnamyle (**50**) et les tubes 31-36, 5.0 mg de cinnamate de benzyle (**49**). Enfin, le cinnamylidène acétate de cinnamyle (**52**) a été recueilli dans le tube 59 (4.8 mg).

j) CF12.CF2-20

500 mg de fraction CF2-20 ont été chromatographiés en phase inverse. Le gradient utilisé était le suivant : 30-40% B (20 min), 40-43% B (20 min), 43-50% B (10 min) et le débit de 15 mL/min. Les tubes 25-29 contenaient 3.7 mg de 5-méthylpinocembrine (**20**) pure à 77%. Puis, 7.0 mg d'un mélange de 1,3-dicoumaroylglycérol (**21**) et de 1-féruloyl-3-coumaroylglycérol (**22**) purs seulement à 96% ont été récupérés dans les tubes 31-40.

7.6.3. Essai de purification par HPLC préparative

L'essai de purification du composé **41** contenu dans la fraction CF7_60-63 par HPLC préparative a été réalisé sur un appareil Varian ProStar 210 avec une colonne Varian Dynamax C18 (250 mm x 21.4 mm, 10 µm). Les conditions de séparation ont tout d'abord été optimisées en HPLC analytique avec une colonne Varian Omnispher 5 C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), puis une transposition a été faite grâce à la formule suivante :

$$t_p = t_a \times \left(\frac{L_p}{L_a}\right) \times \left(\frac{D_p}{D_a}\right)^2 \times \left(\frac{F_a}{F_p}\right)$$

Où :

t_p et t_a : temps d'élution en préparatif et en analytique

L_p et L_a : longueurs de colonne préparative et analytique

D_p et D_a : diamètres de colonne préparative et analytique

F_p et F_a : débits du solvant en préparatif et analytique

Ainsi les colonnes étant de même longueur, si on désire le même temps d'élution en préparatif, il faut appliquer un débit de 21.64 mL/min soit environ 20 mL/min (par rapport à un débit de 1 mL/min en analytique). Il faut noter que cette transposition est simplifiée car on ne tient pas compte de la différence de granulométrie (5 µm pour la colonne analytique et 10 µm pour la préparative).

Les conditions de séparation par HPLC préparative étaient les suivantes : système isocratique 40% H₂O, 60% MeOH avec un débit de 20 mL/min. 8.0 mg de fraction CF7_60-63 ont été dissous

dans 1.5 mL de l'éluant H₂O/MeOH 40/60 puis injectés dans le système. Suite à un problème technique, la séparation s'est effectuée sur 2h30 au lieu de 30 min. Très peu de composé **41** a donc été récupéré car une grande majorité s'est dégradée.

7.7. Quantification des douze marqueurs par HPLC/ DAD

7.7.1. Procédure HPLC/ DAD optimisée (méthode 2)

5 mg d'extrait sec de propolis sont dissous dans 1 mL de MeOH et filtrés sur un filtre à membrane nylon 0.2 µm avant injection. Les échantillons (injection de 10 µL) sont analysés au moyen d'un module de séparation HPLC Waters 2695[®] équipé d'un détecteur à barrette de diodes Waters 2996[®], sur une colonne Phenomenex Luna 3 µm C18 100 A (150x4.6 mm d.i., 3 µm) protégée par un cartouche de protection Phenomenex SecurityGuard (4x3 mm d.i.), à un débit de 0.4 mL/min. La phase mobile est composée d'eau contenant 0.1% d'acide formique (solvant A) et de MeOH contenant 0.1% d'acide formique (solvant B). La séparation a été effectuée en utilisant le gradient suivant : 40% B (0-10 min), 40-50% B (10-25 min), 50-60% B (25-55 min), 60-90% (55-70 min), 90% B (70-80 min). La quantification est réalisée à 280 nm.

7.7.2. Droites d'étalonnage

Des solutions mères dans MeOH des douze marqueurs de concentrations allant de 0.2 à 1.0 mg/mL ont été préparées et diluées au 3/4, 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16. Les équations et coefficients de corrélation des droites d'étalonnage sont rassemblés dans le tableau II-10.

Tableau II-10. Equations et coefficients de corrélation des droites d'étalonnage des 12 marqueurs

Marqueurs	Concentration sol. mère (mg/ mL)	Equation de droite	Coefficient de corrélation (R ²)
Acide caféique (4)	0.5	y= 78.027x	0.9999
Acide p-coumarique (7)	0.5	y= 113.20x	0.9999
Acide férulique (8)	0.3	y= 78.364x	0.9999
Acide isoférulique (9)	0.3	y= 103.68x	0.9998
Acide 3,4-diméthoxycinnamque (11)	0.3	y= 77.748x	0.9998
Pinoembrine (26)	0.8	y= 54.982x	0.9998
Pinobanksine-3-acétate (29)	1.0	y= 49.022x	0.9994
Caféate de prényle (30)	0.4	y= 60.462x	0.9987
Chryisine (34)	0.8	y= 100.4x	0.9998
CAPE (33)	0.3	y= 43.434x	0.9996
Galangine (35)	0.6	y= 48.653x	0.9984
Pinostrobin (47)	0.2	y= 93.633x	0.9995

7.8. Détection HPLC/ UV du dérivé de la catéchine

Le dérivé de la catéchine (**43**) a été analysé par HPLC/UV selon les conditions de la méthode 2 (précédemment définie dans la section 7.7.1). Il présente un temps de rétention de 68.9 min (Figure II-103).

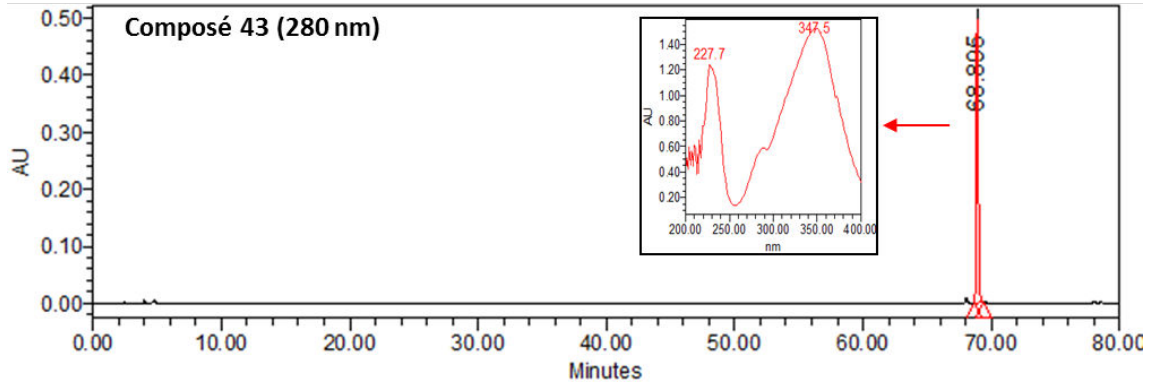


Figure II-103. Chromatogramme HPLC et profil UV du composé 43 (méthode 2)

Les chromatogrammes HPLC des 24 lots constituant le mélange de propolis de Ballot-Flurin ont été comparés un à un à celui du composé **43** afin de valider ou non la présence de ce composé (d'après son temps de rétention et son profil UV).

Bibliographie du chapitre II (177-202)

- (177) Boudet, A. N.; Cornard, J. P.; Merlin, J. C. UV-visible Investigation of the Aluminum (III) Complexes of 3-hydroxy-, 5-hydroxy- and 3',4'-dihydroxy-flavone. In; Greve, Jan; Puppels, Gerwin J.; Otto, Cees: Enschede, Netherlands, 1999; pp. 551–552.
- (178) Porter, L. J.; Markham, K. R. Aluminium Complexes of Flavanones and Dihydroflavonols. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1477–1478.
- (179) González, A. G.; Aguiar, Z. E.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; Vázquez, J. T.; Domínguez, X. A. Flavonoids from *Salvia Texana*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2871–2872.
- (180) Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of NMR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc.; Milwaukee, WI, 1983; Vol. 2, p182.
- (181) Wagner, H.; Chari, V. M.; Sonnenbichler, J. ¹³C-NMR-Spektren Natürlich Vorkommender Flavonoide. *Tetrahedron Letters* **1976**, *17*, 1799–1802.
- (182) Fang, J.-M.; Su, W.-C.; Cheng, Y.-S. Flavonoids and Stilbenes from Armand Pine. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1395–1397.
- (183) HORTON, W. J.; ROBERTSON, D. E. Ultraviolet Spectra of Substituted Acetophenones and Benzoic Acids. *The Journal of Organic Chemistry* **1960**, *25*, 1016–1020.
- (184) Lang, L. *Absorption Spectra in the Ultraviolet and Visible Region*; Academic Press.; New York, 1961.
- (185) Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Wilkins, A. L.; Daldy, J. A.; Lu, Y. HPLC and GC-MS Identification of the Major Organic Constituents in New Zeland Propolis. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 205–211.
- (186) Bankova, V. S. Synthesis of Natural Esters of Substituted Cinnamic Acids. *Journal of Natural Products* **1990**, *53*, 821–824.
- (187) Afolayan, A. J.; Meyer, J. J. M. The Antimicrobial Activity of 3,5,7-Trihydroxyflavone Isolated from the Shoots of *Helichrysum Aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology* **1997**, *57*, 177–181.
- (188) Mazille, F.; Schoettl, T.; Lopez, A.; Pulgarin, C. Physico-Chemical Properties and Photo-Reactivity Relationship for Para-Substituted Phenols in Photo-Assisted Fenton System. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *210*, 193–199.
- (189) Greenaway, W.; May, J.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R. Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of 150 Compounds in Propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **1991**, *46*, 111–121.
- (190) Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R. Composition of Propolis in Oxfordshire, U.K. and Its Relation to Poplar Bud Exudate. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **1988**, *43*, 301–304.
- (191) Falcão, S. I.; Vale, N.; Gomes, P.; Domingues, M. R. M.; Freire, C.; Cardoso, S. M.; Vilas-Boas, M. Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis* **2013**, *24*, 309–318.
- (192) Sanyal, R.; Badami, B. V. A New Synthesis of 3-Arylpropenoic Acids and 5-Phenyl-2,4-Pentadienoic Acid from 4-Acetyl-3-Arylsydones and Arylaldehydes. *Organic Communications* **2009**, *2*, 42–48.
- (193) Popravko, S. A.; Gurevich, A. I.; Kolosov, M. N. Flavonoid Components of Propolis. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* **1969**, *5*, 472–482.
- (194) Yamauchi, R.; Kato, K.; Oida, S.; Kanaeda, J.; Ueno, Y. Benzyl Caffate, an Antioxidative Compound Isolated from Propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1992**, *56*, 1321–1322.
- (195) Park, Y.; Moon, B.-H.; Yang, H.; Lee, Y.; Lee, E.; Lim, Y. Complete Assignments of NMR Data of 13 Hydroxymethoxyflavones. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2007**, *45*, 1072–1075.
- (196) Gripenberg, J.; Honkanen, E.; Silander, K.; Stenhagen, E.; Thorell, B. The Structure of Alpinone. *Acta Chemica Scandinavica* **1956**, *10*, 393–396.

- (197) Sova, M.; Perdih, A.; Kotnik, M.; Kristan, K.; Rižner, T. L.; Solmajer, T.; Gobec, S. Flavonoids and Cinnamic Acid Esters as Inhibitors of Fungal 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase: A Synthesis, QSAR and Modelling Study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 7404–7418.
- (198) Correia, R.; DeShong, P. Palladium-Catalyzed Arylation of Allylic Benzoates Using Hypervalent Siloxane Derivatives†. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 7159–7165.
- (199) Jang, D. S.; Cuendet, M.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. Constituents of *Asparagus Officinalis* Evaluated for Inhibitory Activity against Cyclooxygenase-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 2218–2222.
- (200) Koshino, H.; Terada, S.-I.; Yoshihara, T.; Sakamura, S.; Shimanuki, T.; Sato, T.; Tajimi, A. Three Phenolic Acid Derivatives from Stromata of *Epichloe Typhina* on *Phleum Pratense*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1333–1338.
- (201) Cooper, R.; Gottlieb, H. E.; Lavie, D. New Phenolic Diglycerides from *Aegilops Ovata*. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1673–1675.
- (202) Valencia, D.; Alday, E.; Robles-Zepeda, R.; Garibay-Escobar, A.; Galvez-Ruiz, J. C.; Salas-Reyes, M.; Jiménez-Estrada, M.; Velazquez-Contreras, E.; Hernandez, J.; Velazquez, C. Seasonal Effect on Chemical Composition and Biological Activities of Sonoran Propolis. *Food Chemistry* **2012**, *131*, 645–651.

Chapitre III :

Valorisation biologique

Chapitre III : Valorisation biologique

Après avoir déterminé la composition chimique de la propolis Ballot-Flurin, nous allons nous intéresser à ses activités biologiques. Dans le cadre de cette thèse, quatre activités biologiques ont été évaluées. Parmi ces activités, trois sont couramment associées aux propolis mais néanmoins incontournables, il s'agit des activités antioxydantes, antifongiques et antibactériennes. Une autre activité, jamais évaluée auparavant pour la propolis, est l'activité antiglycante ou anti-AGEs, analysée par le biais d'un test original développé au sein de notre laboratoire. Les activités antioxydantes et anti-AGEs seront exposées dans la première partie de ce chapitre, suivies, dans la seconde partie, des activités antifongiques et antibactériennes.

1. Activités antioxydantes et anti-AGEs

1.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante (activité AO) d'un extrait correspond à sa capacité à protéger un substrat de l'oxydation, notamment par le piégeage des radicaux libres. Deux méthodes ont été choisies afin d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits de propolis BFA : la méthode colorimétrique DPPH et la méthode fluorimétrique ORAC.

1.1.1. Méthode DPPH

a) Principe

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH' (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle). Ce dernier possède un électron non apparié sur un atome d'azote (Figure III-1). Du fait de la délocalisation, les radicaux ne forment pas de dimères entre eux, c'est pourquoi DPPH' reste dans sa forme monomère relativement stable à température ambiante. Cette délocalisation est aussi responsable de la coloration bleu-violette caractéristique de la solution de DPPH'. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical DPPH' (mécanisme de transfert d'électron singulet SET) pour le stabiliser sous forme réduite (DPPH) ; la solution bleu-violette (DPPH') se décolore alors progressivement en jaune pâle (DPPH), décoloration qui est facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm¹²⁴.

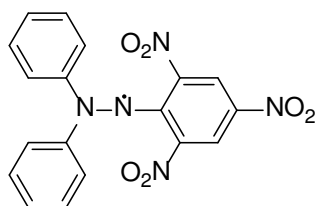


Figure III-1. Structure du radical diphénylpicrylhydrazyle (DPPH')

On mesure souvent la décroissance de la coloration violette au cours du temps, ce qui permet de déterminer l'EC₅₀ (half maximal Extinction Coefficient), c'est à dire le temps après lequel 50% de la coloration initiale ont disparu. Mais cette méthode peut également être standardisée ; c'est ce que nous effectuons dans notre laboratoire. Les résultats sont ramenés à des équivalents Trolox, le Trolox étant un analogue structural hydrosoluble de la vitamine E, et plus particulièrement de l' α -tocophérol (Figure III-2), reconnu pour son activité antioxydante. Cette méthode standardisée est plus particulièrement utilisée dans les études d'extraits végétaux et alimentaires.

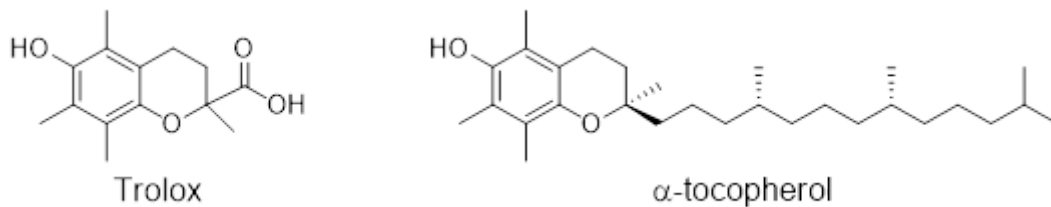


Figure III-2. Structures du Trolox et de l' α -tocophérol (Vitamine E)

b) Activité antioxydante DPPH des extraits de propolis

Les résultats, en ce qui concerne l'activité AO DPPH pour les différents extraits de propolis, sont rassemblés sur la figure III-3.

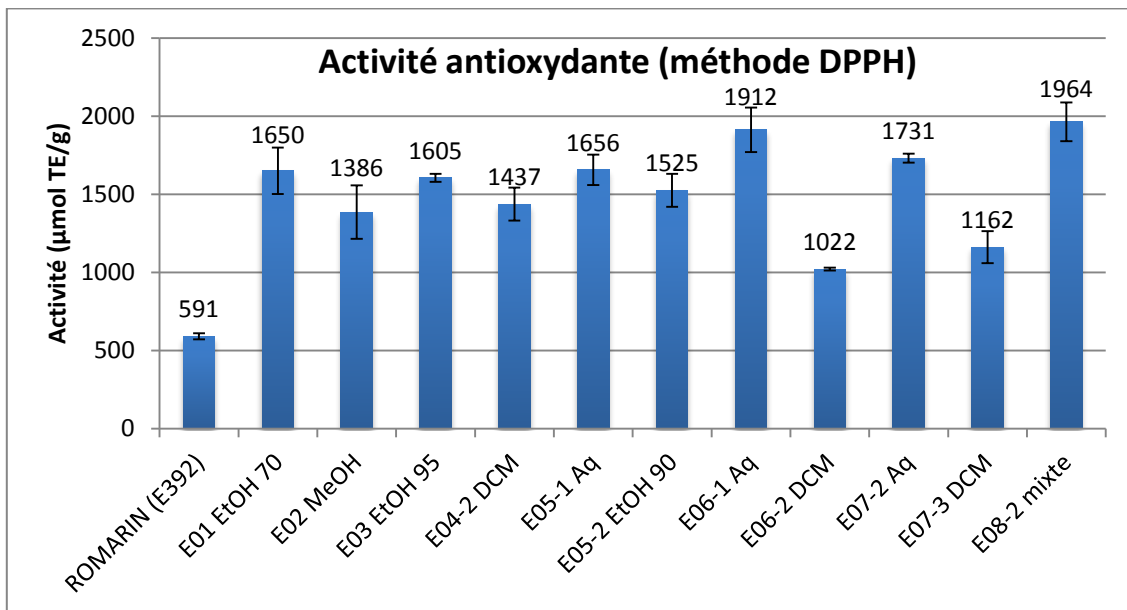


Figure III-3. Activité antioxydante des différents extraits de propolis par la méthode DPPH

L'activité AO des extraits de propolis par la méthode DPPH est comprise entre 1000 et 2000 µmol d'équivalent Trolox par gramme d'extrait (µmol TE/g). Ainsi, elle est 2 à 3 fois supérieure à celle du témoin choisi : l'extrait éthanolique de romarin (E392), additif alimentaire récemment admis par l'UE dans la catégorie des antioxydants [*Journal officiel de l'Union Européenne (Directive 2010/67/UE – L 277/17)*], qui possède une activité antioxydante DPPH similaire à celle du δ -

tocophérol, et plus importante que celle du butylhydroxytoluène (BHT)²⁰³, autre additif alimentaire AO mais de synthèse, cette fois. Les trois extraits aqueux possèdent des valeurs d'activité AO assez élevées (de 1656 à 1912 $\mu\text{mol TE/g}$) et les différences observées ne sont pas significatives (ANOVA, $P < 0.05$). Les extraits E01 EtOH 70% et E08-2 mixte possèdent également une forte activité AO. Les valeurs des extraits alcooliques et DCM (E01-05) ne sont pas significativement différentes (ANOVA, $P < 0.05$). En revanche, les extraits DCM E06-2 et E07-3 sont les moins antioxydants.

De nombreuses études restituent le potentiel AO de la propolis en pourcentage de décroissance du signal par rapport à un témoin caractérisé par une valeur d' EC_{50} . Quelques articles récents (2009-2012) l'expriment en équivalents Trolox. Ainsi, l'activité antioxydante de l'extrait EtOH de propolis française (1605 $\mu\text{mol TE/g}$) est supérieure à celles des EEP provenant de Grèce et de Chypre (entre 330 et 1110 $\mu\text{mol TE/g}$)⁴² et également à celle d'un EEP provenant de Galapa en Colombie (190 $\mu\text{mol/g}$)¹²⁶.

1.1.2. Méthode ORAC

a) Principe

La méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine (structure figure III-4) en présence de radicaux peroxydes générés par l'AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane) dichlorhydrate, structure figure III-4].

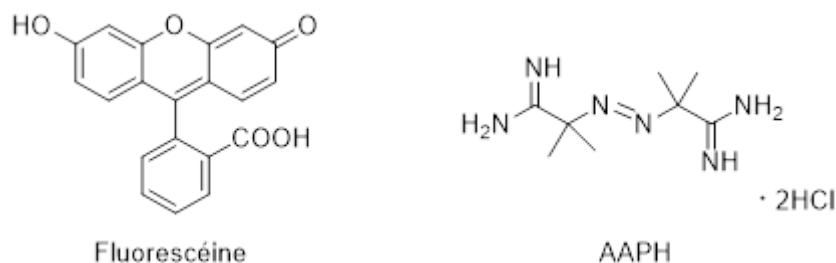


Figure III-4. Structures de la fluorescéine et de l'AAPH

Un antioxydant sera capable de protéger la fluorescéine et donc de retarder la perte de fluorescence par stabilisation du radical peroxyde (mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène HAT). Le test est réalisé en microplaques de 96 puits dans lesquels sont mesurés en parallèle le déclin de l'intensité de fluorescence au cours du temps en présence de concentrations croissantes de Trolox et des échantillons à tester utilisés à différentes concentrations. La méthode faisant intervenir une cinétique, la mesure de l'aire sous la courbe de décroissance de la fluorescence permet de quantifier la capacité antioxydante de l'échantillon. Une comparaison des aires sous courbe obtenues avec la gamme étalon permet d'exprimer les résultats en équivalents Trolox. La méthode ORAC, standardisée, présente l'avantage de combiner à la fois une mesure de l'inhibition de la réaction d'oxydation de la fluorescéine et la durée de cette inhibition.

b) **Activité antioxydante ORAC des extraits de propolis**

Les résultats de l'activité AO par la méthode ORAC pour les extraits de propolis sont consignés sur la figure III-5.

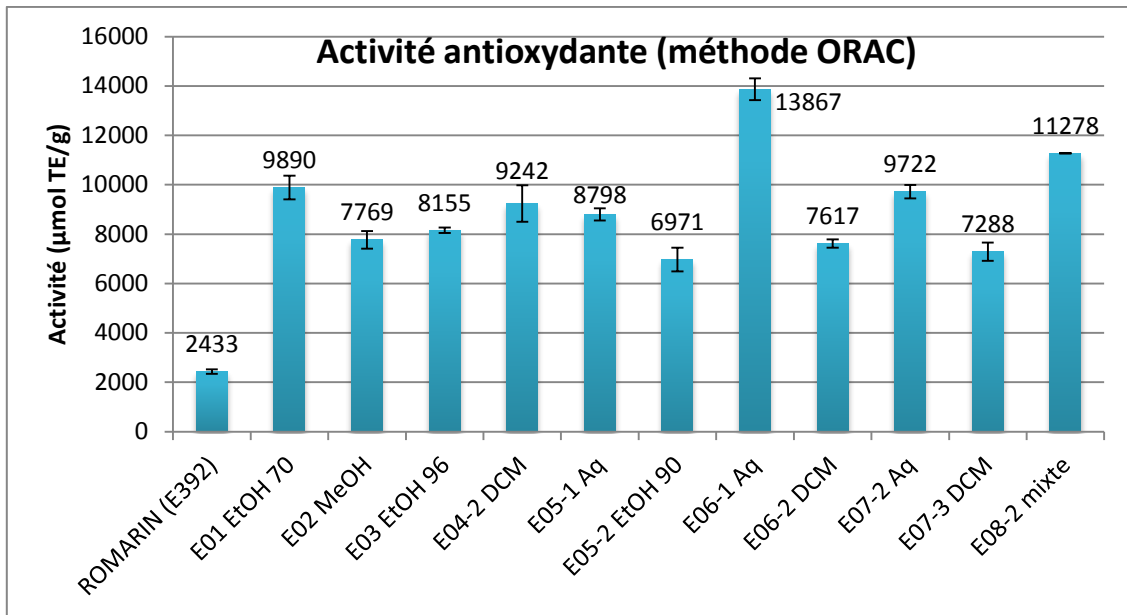


Figure III-5. Activité antioxydante des différents extraits de propolis par la méthode ORAC

Par cette méthode, les valeurs de l'activité antioxydante des différents extraits de propolis sont comprises entre 7000 et 14000 µmol TE/g, soit de l'ordre de 3 à 6 fois supérieures à celle de l'extrait de romarin E392. La valeur la plus élevée est observée pour un extrait aqueux (E06-1 avec 13897 µmol TE/g), mais elle est très différente de celles des autres extraits aqueux (E05-1 et E07-2 avec 8792 et 9722 µmol TE/g). Cette valeur surestimée est sans doute due à une pesée entachée d'erreur du fait du caractère dur et collant des extraits aqueux. Comme avec la méthode DPPH, les extraits E01 EtOH 70 et E08-2 mixte, en plus des extraits aqueux, possèdent les valeurs les plus élevées. De même que pour le test DPPH, nous avons comparé la valeur de l'EEP français de BFA (8155 µmol TE/g), bien supérieure à celle de l'EEP provenant de Galapa en Colombie (1965 µmol TE/g)¹²⁶.

1.1.3. Relations composition-activité antioxydante

a) Relation taux de polyphénols totaux-activité antioxydante

Les activités antioxydantes DPPH et ORAC peuvent être rapprochées des taux de polyphénols totaux (PT). La figure III-6 montre les corrélations entre les PT et l'activité DPPH d'une part, et avec l'activité ORAC d'autre part.

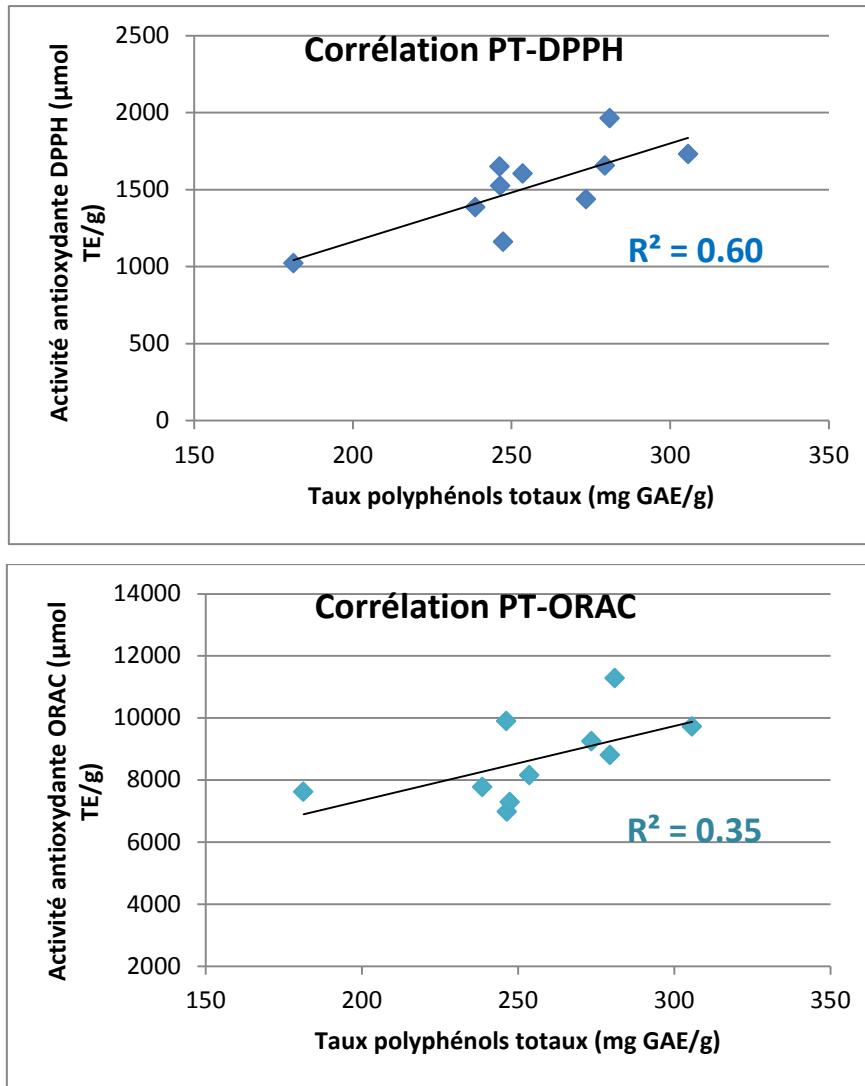


Figure III-6. Corrélations PT-DPPH et PT-ORAC réalisées avec dix extraits de propolis française (E01-08 excepté E06-1 Aq)

On note une corrélation positive entre le taux de polyphénols totaux et les activités antioxydantes DPPH et ORAC. La corrélation est plus forte pour le test DPPH ($R^2=0.60$) que pour le test ORAC ($R^2=0.35$). Néanmoins, ces corrélations sont beaucoup plus faibles que celles décrites par Buratti *et al.*, entre le taux de PT de plusieurs propolis provenant de différentes régions du monde et leur activité antioxydante ($R^2=0.96$)²⁰⁴. Teixeira *et al.*, quant à eux, ne trouvent aucune corrélation entre taux de PT et activité DPPH pour des propolis brésiliennes²⁰⁵.

b) Relation composition-activité antioxydante

Rappelons-nous les chromatogrammes et les compositions chimiques des deux types d'extraits : le type aqueux (Figure III-7 a) et le type organique (alcooliques, DCM et mixte ; figure III-7 b).

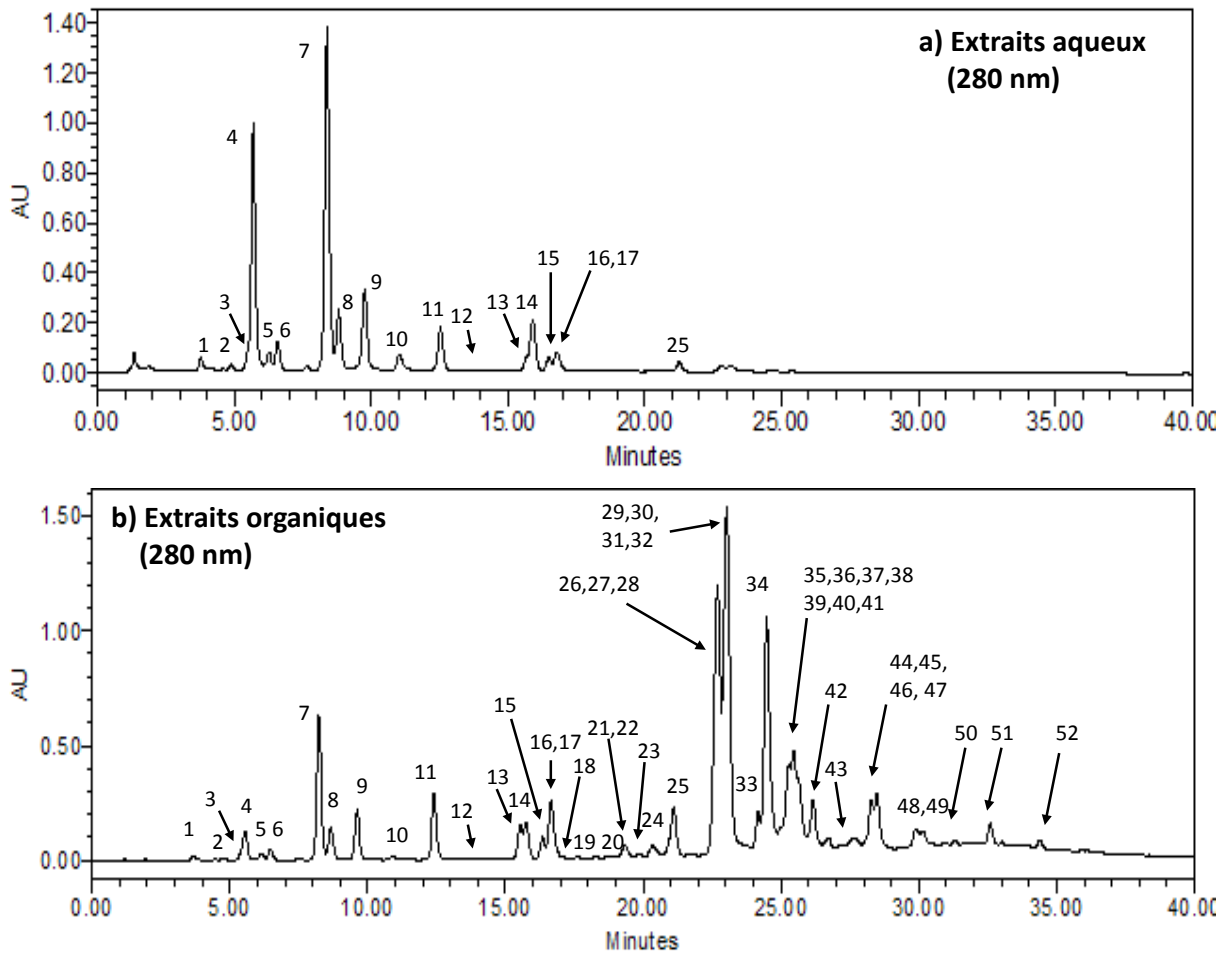


Figure III-7. Extraits aqueux (E05-1 Aq, a) et organiques (E04-2 DCM, b) : 1 3,4-dihydroxybenzaldéhyde, 2 acide 3,4-dihydroxybenzoïque, 3 4-hydroxybenzaldéhyde, 4 acide caféique, 5 vanilline, 6 4-hydroxyacétophénone, 7 acide *p*-coumarique, 8 acide férulique, 9 acide isoférulique, 10 acide benzoïque, 11 acide 3,4-diméthoxycinnamique, 12 acide 3-phénylpropanoïque, 13 5-méthylpinobanksine, 14 acide cinnamique, 15 acide 4-méthoxycinnamique, 16 naringénine, 17 pinobanksine, 18 quercétine, 19 3-méthylquercétine, 20 5-méthylpinocembrine, 21 1,3-dicoumaroylglycérol, 22 1-féruloyl-3-coumaroylglycérol, 23 kaempférol, 24 apigénine, 25 acide cinnamylidène acétique, 26 pinocembrine, 27 caféate de benzyle, 28 caféate d'isopent-3-èneyle, 29 pinobanksine-3-acétate, 30 caféate de prényle, 31 2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol, 32 dérivé d'acide *p*-coumarique (non élucidé), 33 caféate de phényléthyle (CAPE), 34 chrysine, 35 *p*-coumarate de benzyle, 36 galangine, 37 férulate de benzyle, 38 férulate de prényle, 39 rhamnocitrine, 40 kaempféride, 41 phénylallylpinocembrine (nouveau), 42 caféate de cinnamyle, 43 dérivé de la catéchine (nouveau), 44 isoférulate de cinnamyle, 45 *p*-coumarate de cinnamyle, 46 pinostrobinone, 47 alpinone-3-acétate, 48 tectochrysinone, 49 cinnamate de benzyle, 50 benzoate de cinnamyle, 51 cinnamate de cinnamyle, 52 cinnamylidène acétate de cinnamyle.

L'extrait aqueux contient donc majoritairement des acides phénoliques alors que les extraits organiques contiennent davantage d'esters phénoliques et de flavonoïdes. L'activité antioxydante étant élevée pour les deux types d'extraits (aqueux et organiques), elle est donc à la fois supportée par les acides phénoliques d'une part et par les esters et flavonoïdes d'autre part.

c) Relation structure-activité antioxydante

Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour exercer une activité antioxydante (piégeage de radicaux libres) parce qu'ils présentent d'une part des groupements phénols susceptibles de donner un proton ou un électron à un radical libre, et d'autre part, un système aromatique conjugué capable de délocaliser un électron non apparié. L'activité antioxydante DPPH de plusieurs acides et esters phénoliques ainsi que de certains flavonoïdes isolés de la propolis a par ailleurs été évaluée.

• **Acides et esters phénoliques**

La figure III-8 rassemble les valeurs d'activité DPPH (en $\mu\text{mol TE/g}$ puis en $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ entre parenthèses) pour quelques acides et esters phénoliques.

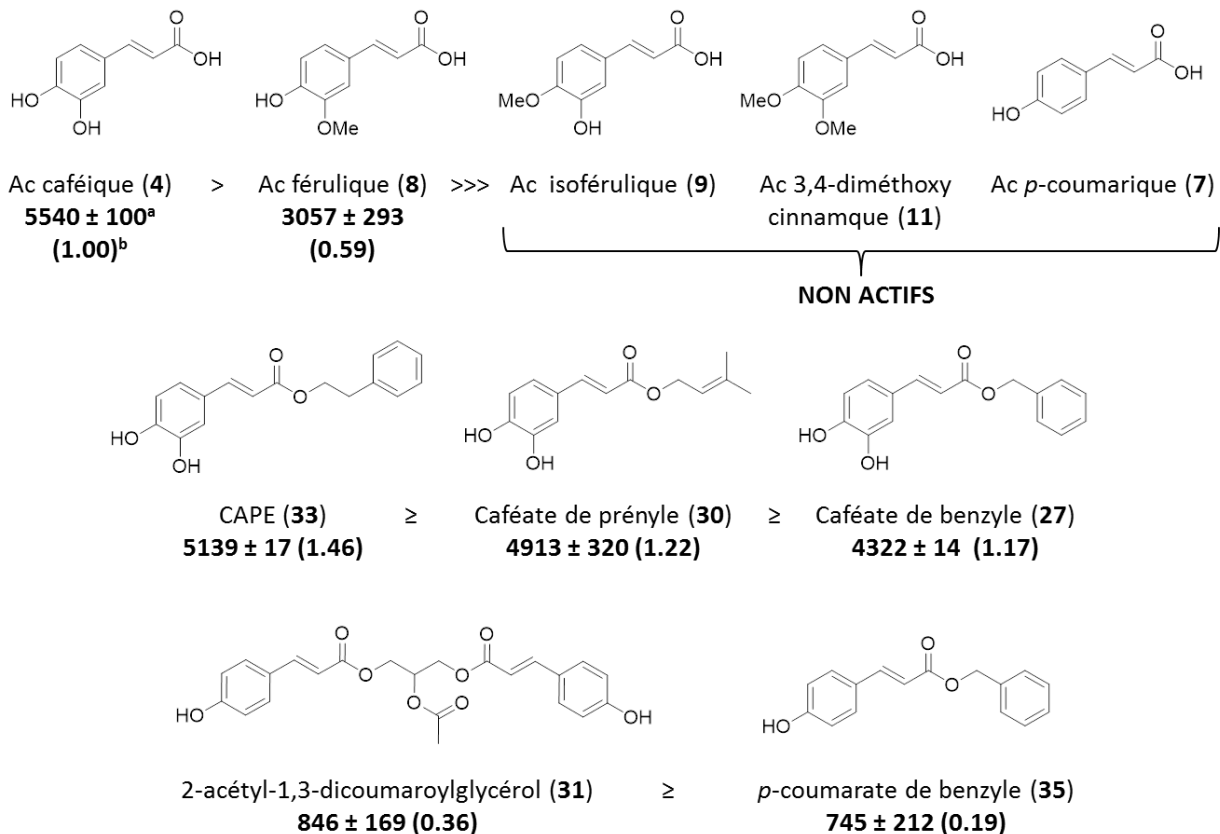


Figure III-8. Valeurs DPPH pour quelques acides et esters phénoliques. ^a exprimées en $\mu\text{mol TE/g}$, ^b exprimées en $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$, référence : acide chlorogénique $3385 \pm 340 \mu\text{mol TE/g}$ ($1.20 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$)

En ce concerne les acides phénoliques, c'est l'acide caféique qui possède l'activité DPPH la plus importante grâce à la présence d'un noyau catéchol (1,2-dihydroxybenzène) et donc la présence de deux fonctions phénols en *ortho*²⁰⁶. Une étude menée par Kawashima *et al.*²⁰⁷ sur des dérivés de l'artépilline C (dérivé diprényle de l'acide *p*-coumarique) a montré que les composés qui possédaient un motif catéchol présentaient les meilleurs activités DPPH, sans doute dues à la stabilisation du radical phényloxy correspondant *via* une liaison hydrogène intramoléculaire, mais également qu'un environnement riche en électrons (groupements électro-donneurs comme les groupements méthoxy) augmentait l'activité antioxydante. Ce qui expliquerait d'une part que l'acide férulique, qui possède une des deux fonctions phénols méthylée (en position 3) soit doué d'un potentiel antioxydant très inférieur à celui de l'acide caféique et d'autre part une plus grande activité de l'acide férulique par rapport à l'acide *p*-coumarique. En revanche, ce qui différencie l'acide férulique de l'isoférulique est la position du groupement OH libre : la position 4 (en *para*) favorisant la délocalisation des électrons. Egalement pour cette raison, les acides hydroxycinnamiques sont plus "efficaces" que leurs homologues hydroxybenzoïques, probablement grâce au radical phényloxy stabilisé par résonance par le groupement $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ lié au noyau phényle²⁰⁸ (Figure III-9).

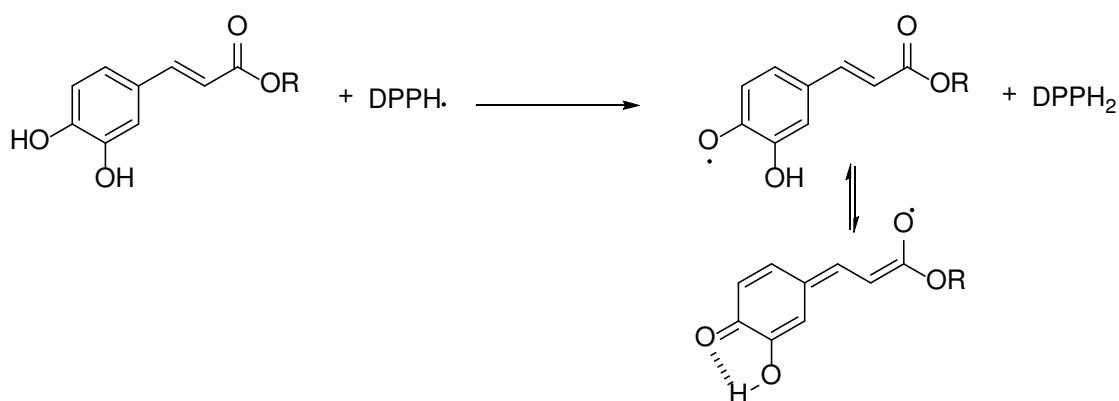


Figure III-9. Réaction de piégeage de radicaux libres par la méthode de DPPH et délocalisation des électrons pour les acides ou esters caféiques (R= H ou groupement carboné)

Quant aux esters phénoliques, les trois caféates analysés sont très actifs, avec des valeurs légèrement supérieures pour le CAPE (**33**) et le caféate de prényle (**30**). Ces fortes valeurs sont ici encore dues au motif catéchol présent dans leur structure. En revanche, le glycérol (**31**) et le *p*-coumarate de benzyle (**35**) ont de faibles activités antioxydantes liées au motif *p*-coumarate (un seul phénol).

• Flavonoïdes

Les quelques flavanones et dihydroflavonols testés sont apparus inactifs (Figure III-10).

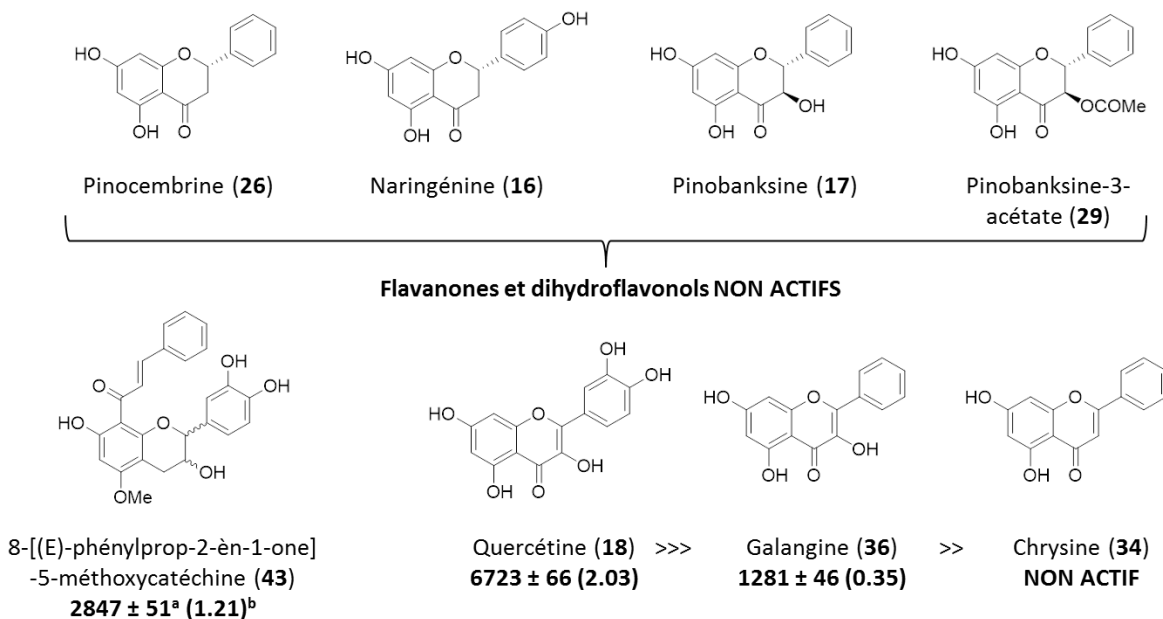


Figure III-10. Valeurs DPPH pour quelques flavonoïdes. ^a exprimées en $\mu\text{mol TE/g}$, ^b exprimées en $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$, référence : acide chlorogénique $3385 \pm 340 \mu\text{mol TE/g}$ ($1.20 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$)

Le composé nouveau **43** possède une activité antioxydante DPPH proche de celle de la référence, l'acide chlorogénique. Parmi les flavones et flavonols, la quercétine (**18**) présente une très forte activité AO devant la galangine (**36**) et la chryisine (**34**), cette dernière étant inactive. Ainsi, pour les flavonoïdes, les principaux facteurs pour déterminer la capacité antioxydante sont les suivants²⁰⁹ :

- la structure de type catéchol sur le cycle B, qui confère une plus grande stabilité de la forme radicalaire et participe à la délocalisation des électrons,
- la double liaison en position 2,3 et la fonction cétone en position 4 du cycle C, qui permet la délocalisation des électrons à partir du cycle B,
- les deux groupements hydroxyles en positions 3 et 5 avec la fonction cétone en position 4 des cycles A et C, qui sont essentiels pour un potentiel AO maximal,
- le groupement hydroxyle libre en position 3 est important pour l'activité AO. Un flavonoïde 3-glycosylé sera moins actif que l'aglycone correspondant (Figure III-11).

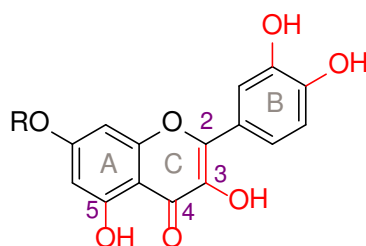


Figure III-11. Groupements et fonctions influençant l'activité antioxydante des flavonoïdes

Ainsi, la quercétine (**18**) est un flavonol qui possède tous les facteurs décrits précédemment pour une activité antioxydante maximale (2.03 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$). La galangine (**36**), quant à elle, ne possède pas les deux groupes hydroxyles en position *ortho* sur le cycle B, et on note que la valeur DPPH est bien plus faible (0.35 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$). Enfin la chrysine, sans OH en position 3, apparaît inactive. Le composé **43** est un flavan-3-ol, il n'a ni double liaison en position 2,3, ni cétone en position 4 mais il possède un noyau catéchol en cycle B. Il possède également un motif chalcone avec des groupements hydroxylés en position 5 et 7 du cycle A, permettant une délocalisation des électrons²¹⁰. C'est sans doute la combinaison de ces deux motifs qui confère à ce dérivé de la catéchine une activité antioxydante du même ordre de grandeur que celle de l'acide chlorogénique. Quant aux flavanones et dihydroflavonols, ils ne sont pas actifs, probablement parce que l'absence de la double liaison en position 2,3 ne permet pas la délocalisation des électrons entre les cycles B et C.

1.2. Activité anti-AGEs

Contrairement à l'activité antioxydante, très étudiée pour les extraits végétaux, l'activité anti-AGEs est beaucoup moins connue et, à notre connaissance, c'est la première fois qu'elle est ici évaluée pour une propolis.

1.2.1. Généralités

Les produits terminaux de la glycation ou AGEs (Advanced Glycation End-products) sont impliqués dans de nombreuses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer²¹¹ mais également dans les complications de certains diabètes²¹² pouvant se manifester sous forme d'athérosclérose²¹³ ou encore d'insuffisance rénale²¹⁴. C'est tout particulièrement l'accumulation de ces AGEs dans le sérum et les tissus qui est néfaste pour l'organisme.

a) Formation des AGEs

La réaction de Maillard est connue dans le domaine médical sous le nom de "glycation non enzymatique des protéines" et a d'abord été étudiée dans le cadre du diabète sucré. En effet, la glycation est une réaction physiologique entre une protéine et un sucre, qui est augmentée lors d'une hyperglycémie²¹⁵. Le schéma de la formation des AGEs (encore appelés produits de Maillard) est représenté sur la figure III-12.

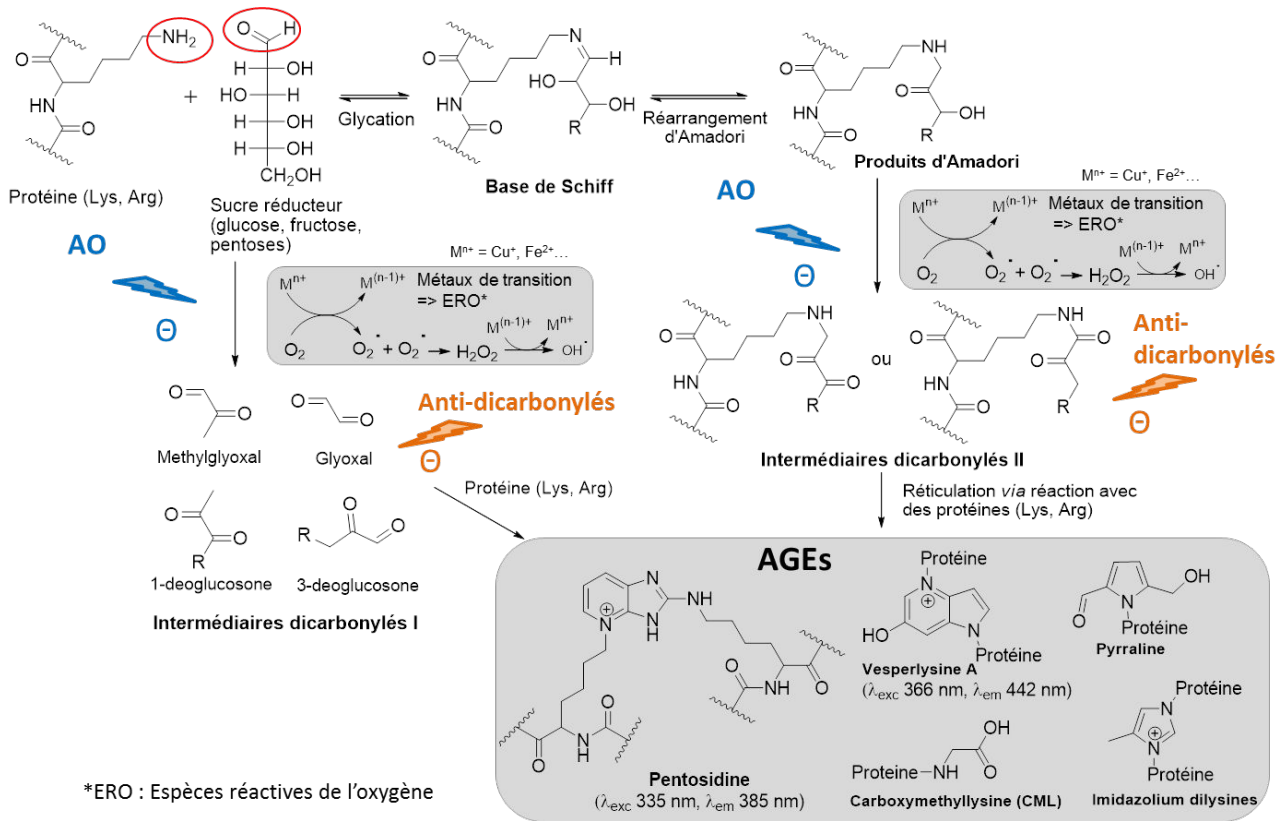


Figure III-12. Formation des AGEs (Schéma adapté d'Ahmed *et al.*²¹²)

Le groupement amine primaire d'une protéine de type lysine ou arginine réagit avec le carbonyle d'un sucre réducteur comme le glucose, le fructose, ou encore des pentoses pour donner, la base de Schiff correspondante (réaction de glycation). Celle-ci se réarrange ensuite en produit d'Amadori, une cétoamine plus stable. Des réactions d'oxydation, catalysées par des métaux de transition, vont alors conduire à la formation d'intermédiaires dicarboxylés (type II) qui, réagissant de nouveau avec d'autres protéines, vont former les AGEs. De la même façon, il peut se former des AGEs à partir des dérivés du glyoxal, provenant de l'auto-oxydation des sucres réducteurs. Parmi les AGEs formés, certains sont fluorescents, c'est le cas notamment de la pentosidine et de la vesperlysine A. Ainsi, des composés anti-AGEs peuvent emprunter différentes voies dans le but de prévenir la formation des AGEs. Par exemple, ils peuvent empêcher la réaction de glycation en réagissant en amont avec soit l'amine primaire de la protéine, soit le carbonyle du sucre réducteur ; ils peuvent, s'ils sont dotés de propriétés antioxydantes (piégeage de radicaux libres ou chélation de métaux de transition), réduire les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ainsi la formation des intermédiaires dicarboxylés (type I) ; enfin, ils peuvent agir en piégeant les intermédiaires dicarboxylés ou même en les neutralisant, ces anti-AGEs sont alors qualifiés de breakers²¹⁶.

b) Potentiel anti-AGEs et antioxydant : action antiglycoxydante

La réaction de glycation est un processus auto-généré, elle a lieu spontanément. Un inhibiteur de la formation des AGEs doit donc idéalement présenter une demi-vie (temps au bout duquel l'inhibiteur va perdre la moitié de son action anti-AGEs) assez longue, associée à une toxicité la plus faible possible puisqu'il sera administré durant de longues périodes²¹². La plupart des étapes de la glycation s'accompagnent d'un stress oxydant de telle façon que l'ensemble du processus est souvent désigné sous le terme de glycoxydation. En effet, de nombreuses étapes de la glycation génèrent des ERO (cf. figure III-12), aboutissant à la formation d'aldéhydes réactifs dont l'un des plus abondants est le méthylglyoxal (MGO)²¹⁵. Des polyphénols ubiquitaires tels que la quercétine sont déjà reconnus comme inhibant significativement la réaction de glycation *in vitro* et *in vivo*²¹⁷. Ainsi, des composés naturels qui présenteraient à la fois des activités antioxydantes et anti-AGEs apparaîtraient-ils comme de très bons candidats pour la chémoprévention des maladies impliquant les AGEs.

1.2.2. Principe du test

La technique développée au laboratoire^{218,219} pour l'évaluation de l'activité anti-AGEs d'extraits ou de composés purifiés repose sur la fluorescence de certains AGEs²²⁰. La réaction de glycation est simulée *in vitro* en faisant réagir une protéine, l'albumine de sérum bovin (BSA), avec un sucre, le ribose, dans des conditions physiologiques. Au bout de 24 heures, la fluorescence induite par la formation des AGEs de type pentosidine est alors mesurée. Un inhibiteur de la formation des AGEs diminuera la quantité d'AGEs formés et entrainera donc une baisse d'intensité du signal de fluorescence (Figure III-13).

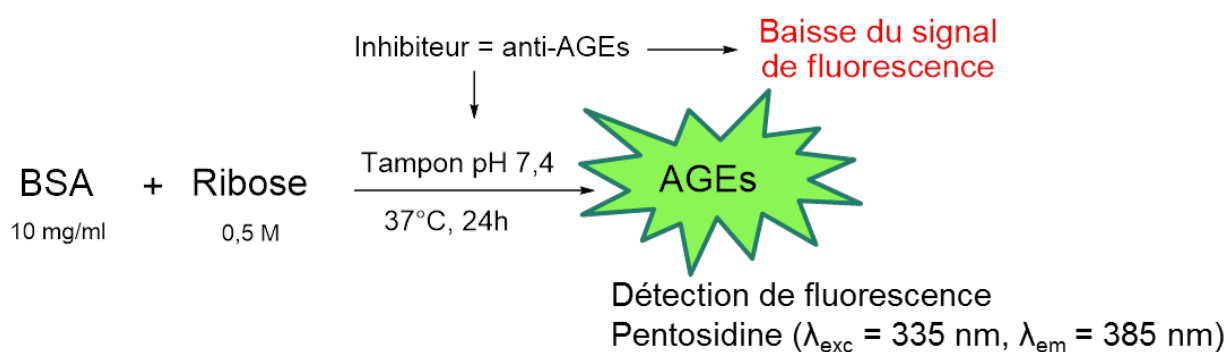


Figure III-13. Principe du test anti-AGEs

L'établissement de courbes "dose-effet" permet alors la détermination de la concentration inhibant 50% (CI_{50}) de la formation des AGEs de type pentosidine.

Il s'agit d'un test chimique, réalisé dans des microplaques de 96 puits et automatisé, utilisé pour le criblage d'extraits ou de molécules à potentialités anti-AGEs (plus de 1600 échantillons analysés à ce jour). Une étude antérieure avait permis de conclure, grâce à l'évaluation du Z' facteur (0.62), que ce test de criblage était de bonne qualité et donc qu'une seule mesure par échantillon était suffisante²¹⁸. Il est donc simple à mettre en œuvre, peu coûteux et relativement rapide (24h). Il est assez sensible car il permet de détecter des activités de l'ordre du micromolaire (pour les molécules les plus actives). L'inconvénient de ce test est qu'il mesure une fluorescence globale. Ainsi, ne peut-on, par exemple, exclure l'existence d'interférences avec la fluorescence intrinsèque de certains composés. De plus, même si les AGEs formés au cours de ce test sont majoritairement de type pentosidine, d'autres types d'AGEs (non fluorescents ou fluorescents à d'autres longueurs d'onde) peuvent également se former. Cependant, ils ne pourront être quantifiés par cette méthode.

1.2.3. Activité anti-AGEs des extraits de propolis

Les valeurs de l'activité anti-AGEs des différents extraits de propolis BFA sont rassemblées dans le tableau III-1.

Tableau III-1. Activité anti-AGEs des différents extraits de propolis

Extraits	Cl ₅₀ (mg/ mL)*	Extraits	Cl ₅₀ (mg/ mL)*
E01 EtOH 70	0.03	E06-2 DCM	0.04
E02 MeOH	0.03	E07-2 Aq	0.36
E03 EtOH 96	0.05	E07-3 DCM	0.03
E04-2 DCM	0.03	E08-2 mixte	0.04
E05-1 Aq	0.48	Aminoguanidine	0.12
E05-2 EtOH 90	0.06	<i>S. Japonicum</i>	0.09
E06-1 Aq	0.19	Quercétine	0.06

* n=1

La Cl₅₀ étant la concentration inhibant 50% de la formation des AGEs, plus cette Cl₅₀ est faible, plus l'activité anti-AGEs est forte. Les extraits alcooliques, DCM et mixte (tous exceptés ceux aqueux) montrent une très bonne activité puisque la Cl₅₀ est similaire (E05-2 EtOH 90 : 0.06 mg/mL) et jusqu'à deux fois plus faible (E01 EtOH 70, E02 MeOH, E04-2 et E07-3 DCM : 0.03 mg/mL) que celle de la quercétine, flavonol pris comme témoin (0.06 mg/mL). Ces extraits ont même une Cl₅₀ inférieure à celle de l'extrait de boutons floraux de *Styphnolobium japonicum* (anciennement *Sophora Japonica*), riche en rutoside (15 à 20%)²²¹ (Cl₅₀ = 0.09 mg/mL). En revanche, il ressort que les extraits aqueux ont une activité anti-AGEs beaucoup plus faible (Cl₅₀ entre 0.19 et 0.48 mg/mL) que l'aminoguanidine (0.12 mg/mL), prise également comme référence. L'aminoguanidine (aussi appelée pimagédine) est une hydrazine nucléophile qui a reçu beaucoup d'attention pour être développée en tant que médicament à potentiel antiglycant²²². Mais il s'est avéré que ce composé entraînait des

effets secondaires chez les patients, comme des symptômes grippaux, perturbations gastro-intestinales et des anémies, et de ce fait, l'aminoguanidine n'est pas utilisée à des fins thérapeutiques²¹². La quercétine apparaît ici, dans les conditions de notre test, plus active que l'aminoguanidine et sera donc choisie comme témoin.

1.2.4. Fractionnement bioguidé

Afin d'identifier les composés les plus actifs, l'activité anti-AGEs a été évaluée sur les 21 premières fractions de la chromatographie Flash CF2 (phase normale, 21 g d'extrait DCM) qui ont également servi à l'identification des constituants de la propolis de BFA. La figure III-14 illustre graphiquement les CI_{50} (mg/mL) de ces fractions.

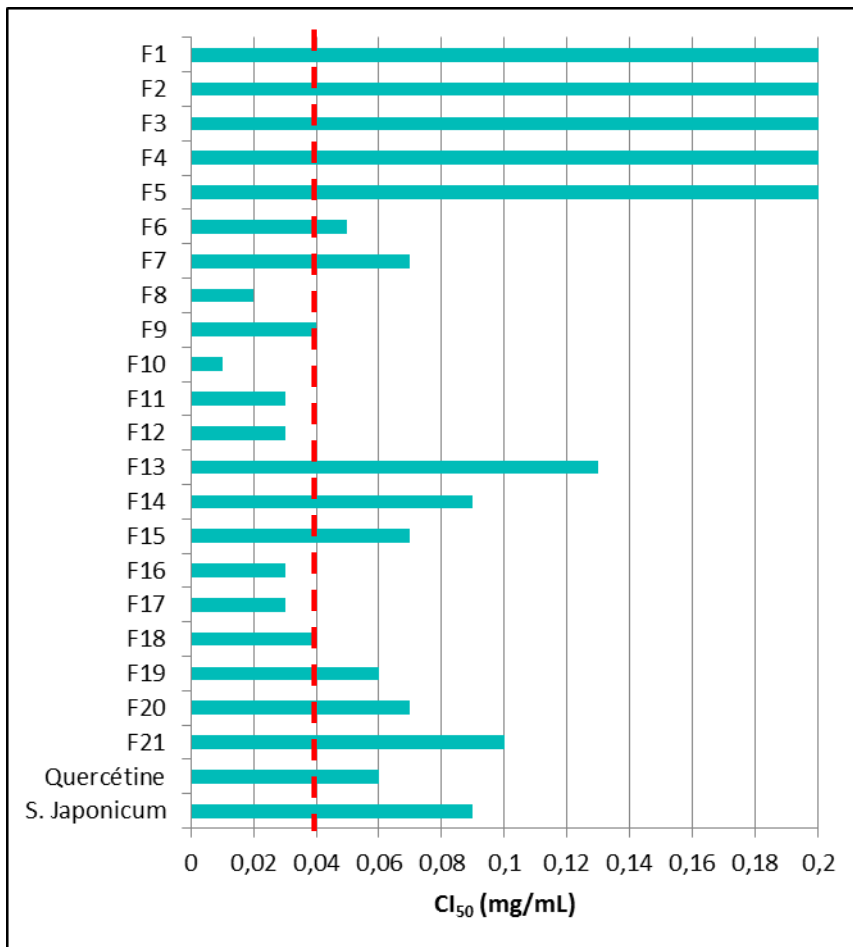


Figure III-14. Fractionnement bioguidé (activité anti-AGEs) de l'extrait DCM

Les 5 premières fractions ont une $CI_{50} > 1$ mg/mL (plafonnée à 0.2 mg/mL pour une meilleure visibilité du graphique), ce sont les fractions les plus apolaires et elles contiennent sans doute encore un peu de cire, elles ne sont pas actives. Seules les fractions dont l' $IC_{50} \leq 0.04$ mg/mL ont été retenues comme les plus actives. Les chromatogrammes HPLC, enregistrés à 280 nm, des huit fractions actives sont regroupés sur la figure III-15.

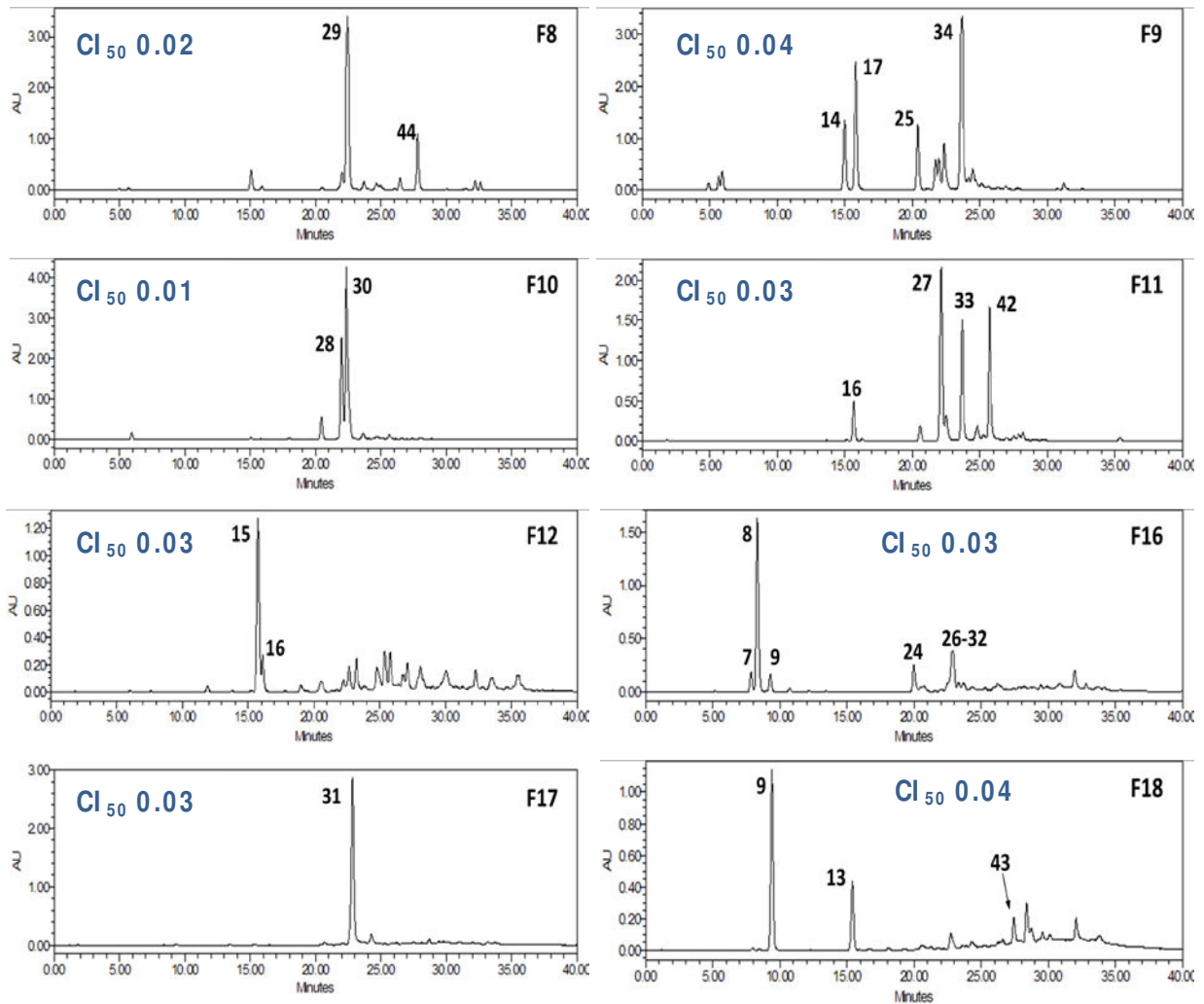


Figure III-15. Chromatogrammes HPLC des huit fractions les plus actives (λ 280 nm, méthode 1) : 7 acide *p*-coumarique, 8 acide férulique, 9 acide isoférulique, 13 5-méthylpinobanksine, 14 acide cinnamique, 15 acide 4-méthoxycinnamique, 16 naringénine, 17 pinobanksine, 24 apigénine, 25 acide cinnamylidène acétique, 26 pinocembrine, 27 caféate de benzyle, 28 caféate d'isopent-3-ényle, 29 pinobanksine-3-acétate, 30 caféate de prényle, 31 2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol, 32 dérivé d'acide *p*-coumarique (non élucidé), 33 caféate de phényléthyle (CAPE), 34 chryisine, 42 caféate de cinnamyle, 43 dérivé de la catéchine (nouveau), 44 isoférulate de cinnamyle

1.2.5. Identification des composés anti-AGEs actifs

Les composés majoritairement présents (et disponibles en quantités suffisantes) dans ces huit fractions ont été testés individuellement (Tableau III-2).

Tableau III-2. Activité anti-AGEs des composés purs

Composé (n°)	Fraction	CI ₅₀ (mM)
Pinobanksine-3-acétate (29)	F8	0.06
2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol (31)	F17	0.07
Pinobanksine (17)	F9	0.08
Caféate de prényle (30)	F10	0.09
5-méthylpinobanksine (13)	F18	0.10
Naringénine (16)	F11-F12	0.2
Caféate de benzyle (27)	F11	0.4
Caféate de cinnamyle (42)	F11	0.5
Isoférulate de cinnamyle (44)	F8	0.6
Acide férulique (8)	F16	0.7
Dérivé de la catéchine (43)	F18	0.8
Acide isoférulique (9)	F18	0.9
Caféate de phényléthyle CAPE (33)	F11	1.6
Acide p-coumarique (7)	F16	> 3
Acide cinnamique (14)	F9	> 3
Chrysine (34)	F9	> 3

Ces molécules peuvent être réparties en trois groupes. Le premier groupe rassemble les composés les plus actifs ($CI_{50} \leq 0.10$ mM), c'est le cas de la pinobanksine-3-acétate (29) (composé le plus actif, 0.06 mM), de la pinobanksine (17) (0.08 mM) et de la 5-méthylpinobansine 13 (0.10 mM) ainsi que du 2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol (31) (0.07 mM) et du caféate de prényle (30) (0.09 mM). Le deuxième comprend des molécules d'activité moyenne ($0.2 \leq CI_{50} \leq 1.6$ mM) : c'est le cas par exemple de la naringénine (16) (0.2 mM), de l'acide férulique (8) (0.7 mM) ou encore du CAPE (33) (1.6 mM). Enfin, dans le troisième et dernier groupe, on retrouve des molécules quasiment inactives ($CI_{50} > 3$ mM) comme l'acide p-coumarique (7) ou encore la chrysine (34).

1.2.6. Relation composition-activité anti-AGEs

Comme cela est suggéré par la figure III-12 (page 137), l'activité anti-AGEs est souvent associée à l'activité AO. En effet, Lou *et al.* ont montré que l'activité inhibitrice de la formation des AGEs de certains flavonoïdes était en accord avec leur activité DPPH²²³. Il a aussi été décrit que les flavonoïdes agissaient en tant que piègeurs de radicaux libres et/ou agents chélatants de métaux de transition, et que les catéchines du thé telles que le gallate d'épigallocatechine inhibaient la formation des AGEs au moyen de leur activité de piégeage de radicaux²²⁴. Matsuda *et al.* ont eux aussi montré que plusieurs flavonoïdes possédant une forte activité anti-AGEs avaient tendance à présenter également une forte activité de piégeage des radicaux DPPH[•] et $\cdot O_2^-$. Cependant, ils ont noté

quelques exceptions : certains flavonoïdes tels que l'apigénine, la wogonine ou encore la rhamnétine présentait une forte activité anti-AGEs associée à une faible activité AO²²⁵. Dans cette optique, nous avons voulu vérifier s'il existait un lien entre l'activité AO évaluée par le test DPPH et l'activité anti-AGEs au niveau de nos extraits de propolis comme au niveau de ses principaux constituants.

a) Relation antioxydant-anti-AGEs

Nous avons déjà vu que les extraits E01-08 présentaient tous une activité AO (DPPH) comprise entre 1000 et 2000 $\mu\text{mol TE/g}$ d'extrait, mais que seuls les extraits organiques étaient dotés d'un potentiel antiglycant ($\text{CI}_{50} \leq 0.06 \text{ mg/mL}$) (cf. annexe 7 page 361). Les résultats sont représentés sur la figure III-16.

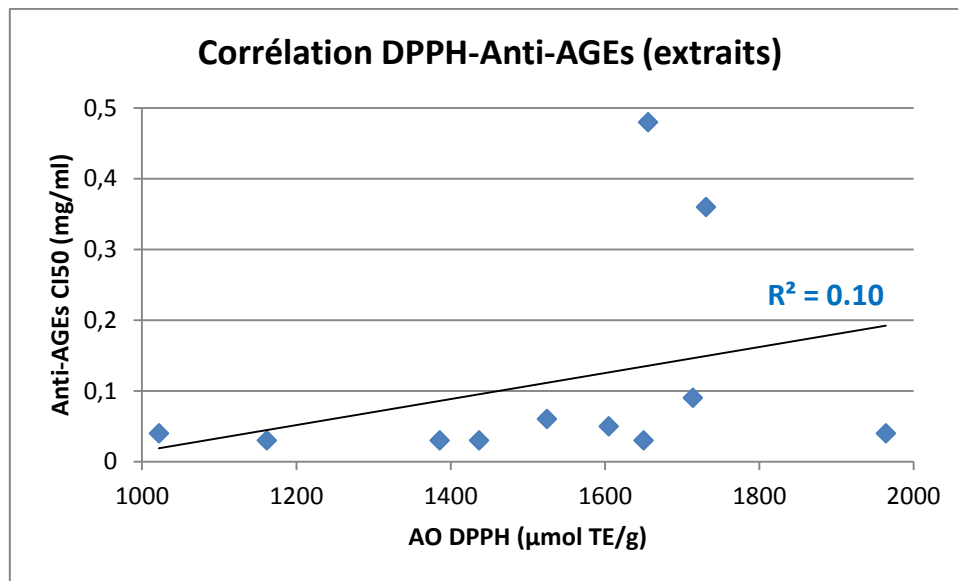


Figure III-16. Corrélation DPPH-anti-AGEs réalisée avec dix extraits de propolis (E01-08 excepté E06-1 Aq) et l'extrait EtOH de *S. Japonicum*

L'activité anti-AGEs ne semble pas corrélée avec l'activité AO (coefficient de corrélation $R^2 = 0.10$ faible). L'activité AO ne peut donc pas expliquer à elle seule l'inhibition de la formation des AGEs.

Parmi les constituants de la propolis de BFA, 17 ont également servi de support pour l'étude de la corrélation AO-anti-AGEs (Figure III-17, Annexe 7).

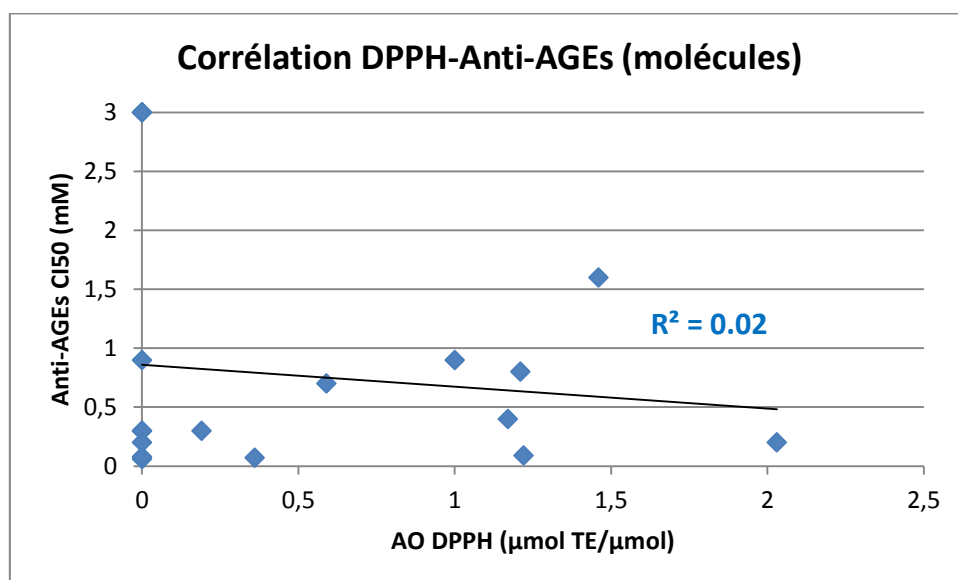


Figure III-17. Corrélation DPPH-anti-AGEs réalisée avec 17 constituants de la propolis (composés 4, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 43)

Cette fois-ci encore, le coefficient de corrélation est très faible ($R=0.02$), cela confirme que l'on ne peut établir ici de lien entre l'activité AO d'un composé et son activité anti-AGEs.

On a principalement évoqué jusqu'à présent l'activité antioxydante *via* le piégeage des radicaux. Elle peut également se manifester au travers de la complexation de certaines molécules avec les métaux de transition (MT) et principalement le fer et le cuivre.

b) Relation structure-activité chélation métaux de transition

D'une façon générale, les relations structure-activité AO (piégeage radicaux) et structure-activité AO (chélation MT) sont assez similaires. Au niveau des flavonoïdes, ils seront d'autant plus actifs s'ils possèdent dans leur structure le maximum de sites de chélation *i.e.* la double liaison en position C2-C3, qui semble indispensable à une chélation stable, les fonctions hydroxyles en C3 et oxo en C4 des flavonols, le motif 5,6,7-trihydroxyle sur le cycle A des flavones et également le motif catéchol sur le cycle B. Ainsi, Porfírio *et al.* ont montré que les flavonols tels que la morine, la quercétine ou la fisétine (structures figure III-18), possédant deux à trois sites de chélation se complexaient plus facilement avec Fe^{2+} que la chrysine (flavone) ou la catéchine (flavan-3-ol) qui n'en possédaient qu'un seul, et que la complexation augmentait l'activité AO de ces flavonols²²⁶. Riha *et al.* ont quant à eux montré que les flavonoïdes tels que la 3-hydroxyflavone, le kaempférol ainsi que la baicaléine (structures figure III-18) étaient des agents chélatant du cuivre très efficaces²²⁷.

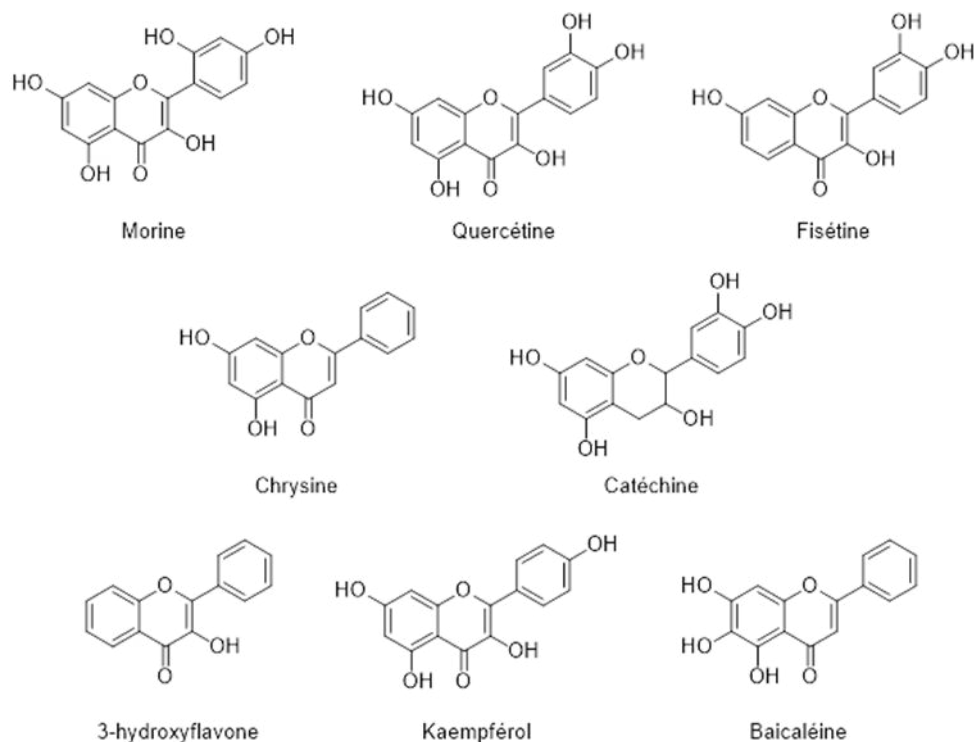


Figure III-18. Structures des flavonoïdes ayant servis de support aux études de chélation avec les métaux de transitions^{226,227}

Les dérivés des acides hydroxycinnamiques ont également été décrits comme complexant les ions Cu^{2+} , les plus efficaces étant ceux possédant deux fonctions phénols en position *ortho*, *i.e.* les dérivés de l'acide caféique²²⁸.

Cependant cette voie d'inhibition de la formation des AGEs n'est que peu envisageable dans notre cas pour expliquer l'activité anti-AGEs de nos extraits et de ses molécules majoritaires, car il est peu probable, dans les conditions de notre test, d'être en présence de métaux de transition.

c) Relation structure-activité anti-dicarbonylés

Si on s'intéresse de plus près au groupe des molécules les plus actives ($\text{CI}_{50} \leq 0.10 \text{ mM}$), on remarque que parmi ces cinq molécules se trouvent trois dérivés de la pinobanksine, dont le plus actif est la pinobanksine-3-acétate (**29**), le composé majoritaire des extraits organiques de propolis BFA. On retrouve aussi le caféate de prényle (**30**) et le 2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol (**31**) qui font partie des dix premiers composés majoritaires, ce qui explique la forte activité anti-AGEs des extraits organiques.

Quel peut alors être le lien entre la structure chimique des dérivés de la pinobanksine par exemple et l'intensité de l'activité anti-AGEs? Lo *et al.* ont montré que les épicatechines contenues dans le thé vert permettaient de réduire *in vitro* la concentration d'espèces réactives α - β -dicarbonylées comme le méthylglyoxal (MGO) dans des conditions physiologiques²²⁹. Ainsi, le (-)-

épigallocatechine gallate (EGCG) peut piéger le MGO en fixant ce dernier en position 8 (Figure III-19).

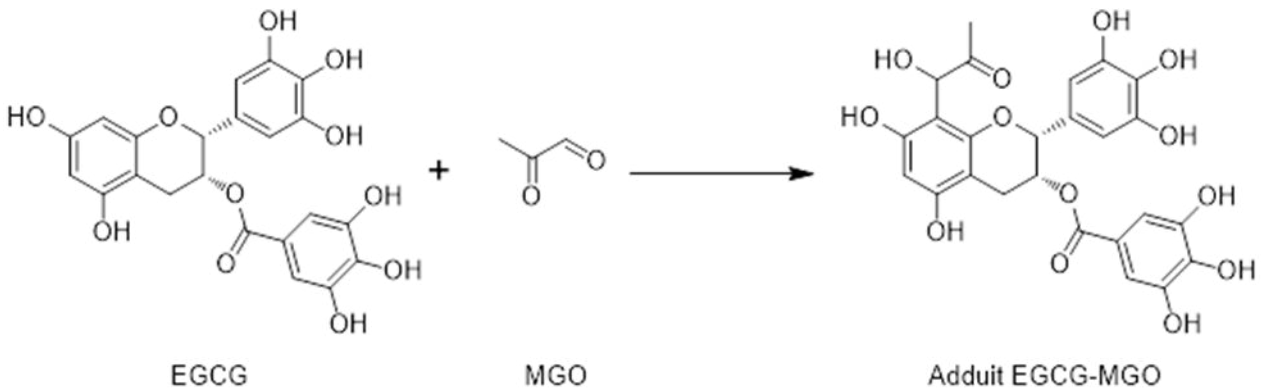


Figure III-19. Piégeage du méthylglyoxal (MGO) par l'épigallocatechine gallate (EGCG) (schéma reproduit de Lo *et al.*²²⁹)

En présence de 3 équivalents de MGO pour un EGCG, Sang *et al.* ont non seulement obtenu des adduits mono-MGO-EGCG en position 8 ou en position 6 mais également des adduits di-MGO EGCG en positions 6 et 8, le caractère nucléophile de ces positions étant augmenté par un pH légèrement alcalin (Figure III-20)²³⁰.

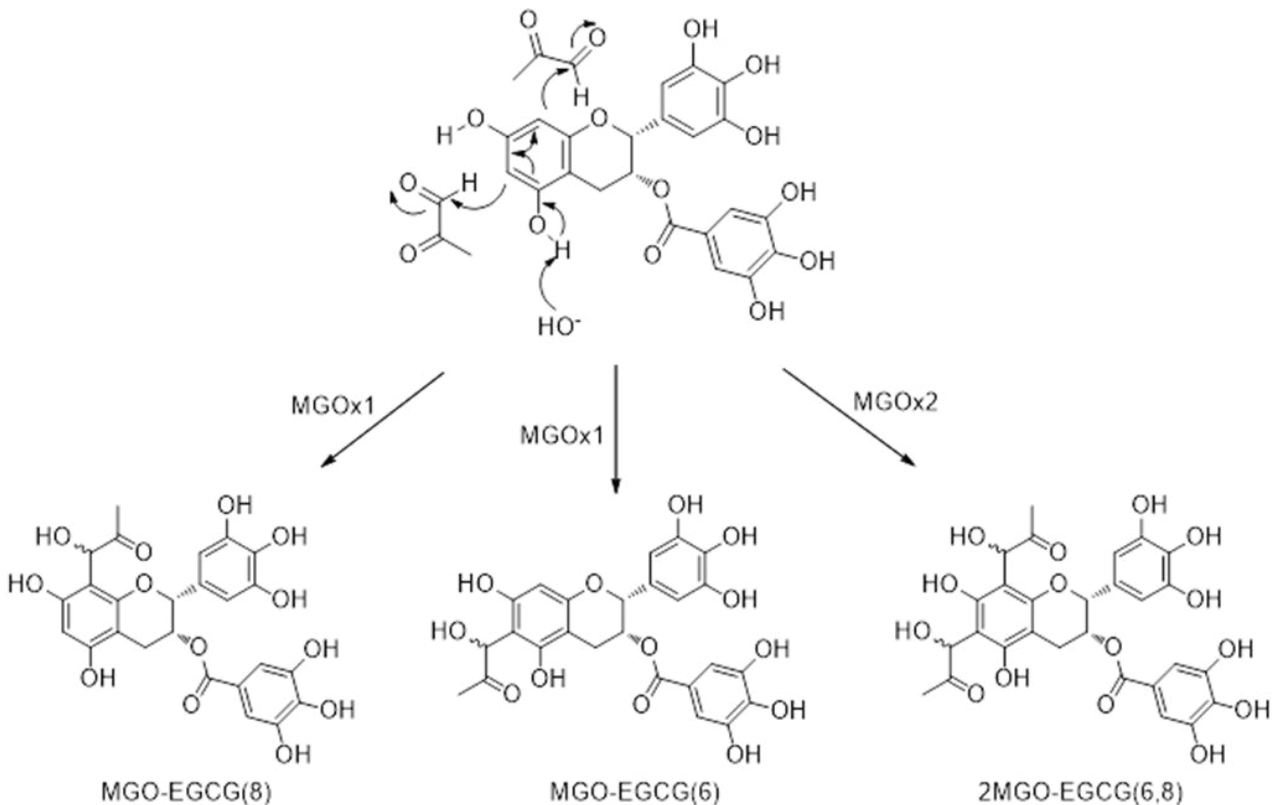
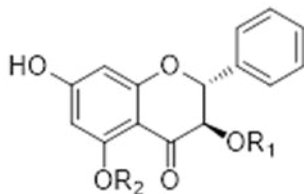


Figure III-20. Voies de formation des adduits mono et di-MGO-EGCG sous conditions neutres ou basiques (schéma reproduit de Sang *et al.*²³⁰)

Ainsi les dérivés de la pinobanksine, sans substituant en position 6 et 8 (Figure III-21) pourraient-ils piéger de façon similaire les composés dicarbonylés, réduisant ainsi la formation des AGEs.

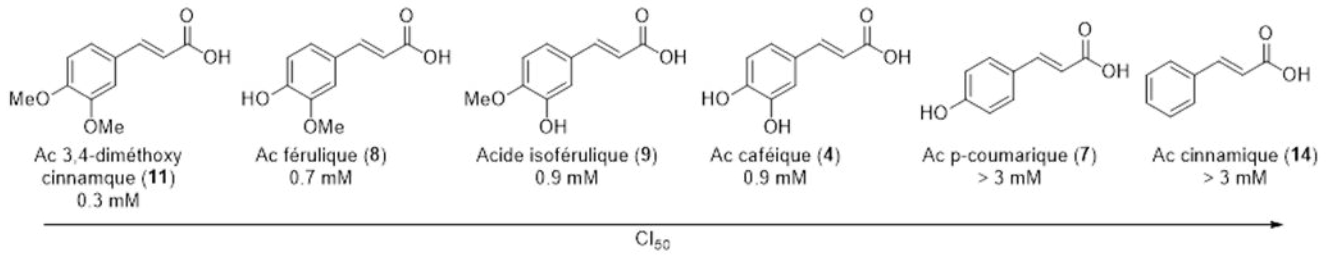


R ₁ =H,	R ₂ =Me	5-méthylpinobanksine (13)	Cl ₅₀ =0.10 mM
R ₁ =H,	R ₂ =H	Pinobanksine (17)	Cl ₅₀ =0.08 mM
R ₁ =COMe,	R ₂ =H	Pinobanksine-3-acétate (29)	Cl ₅₀ =0.06 mM

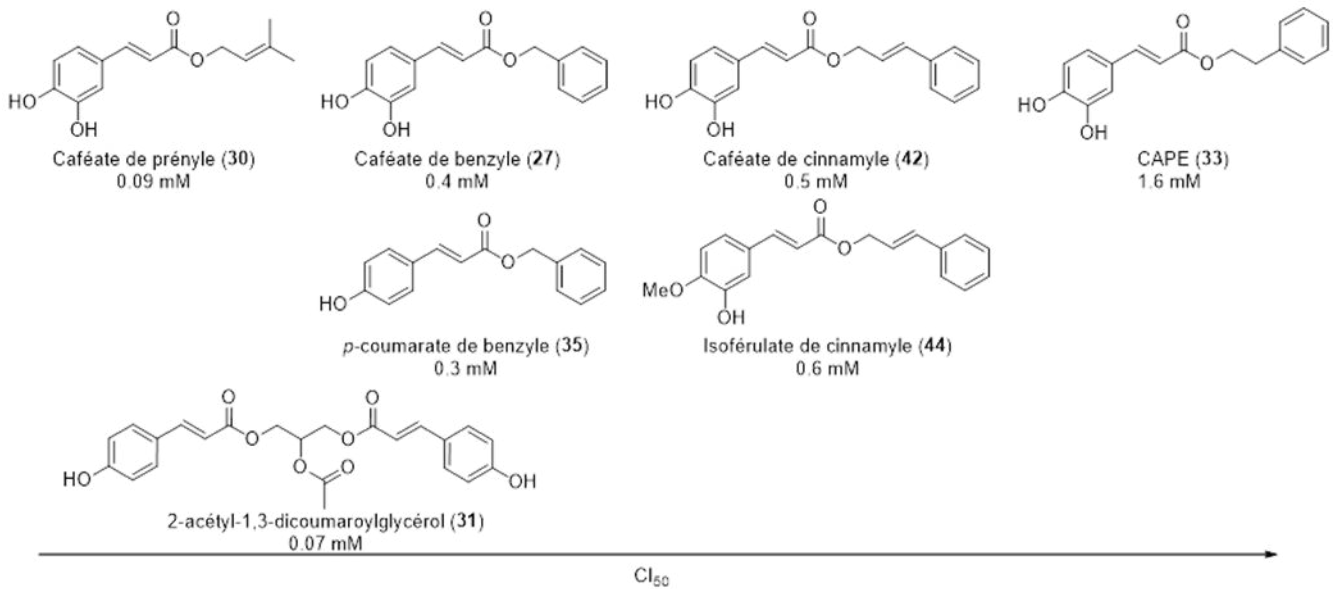
Figure III-21. Structure des dérivés de la pinobanksine

A l'appui de cette hypothèse la 5-méthylpinobanksine (**13**), ayant l'un des deux groupements phénols du cycle A méthylé, semble moins active que la pinobanksine (**17**) et la pinobanksine-3-acétate (**29**). Dans le but de mieux appréhender cette question de relation structure-activité, d'autres composés purs ont également été évalués. Les résultats, par catégories, sont rassemblés sur la figure III-22.

a) Dérivés d'acide cinnamique



b) Dérivés d'ester cinnamique



c) Flavonoïdes

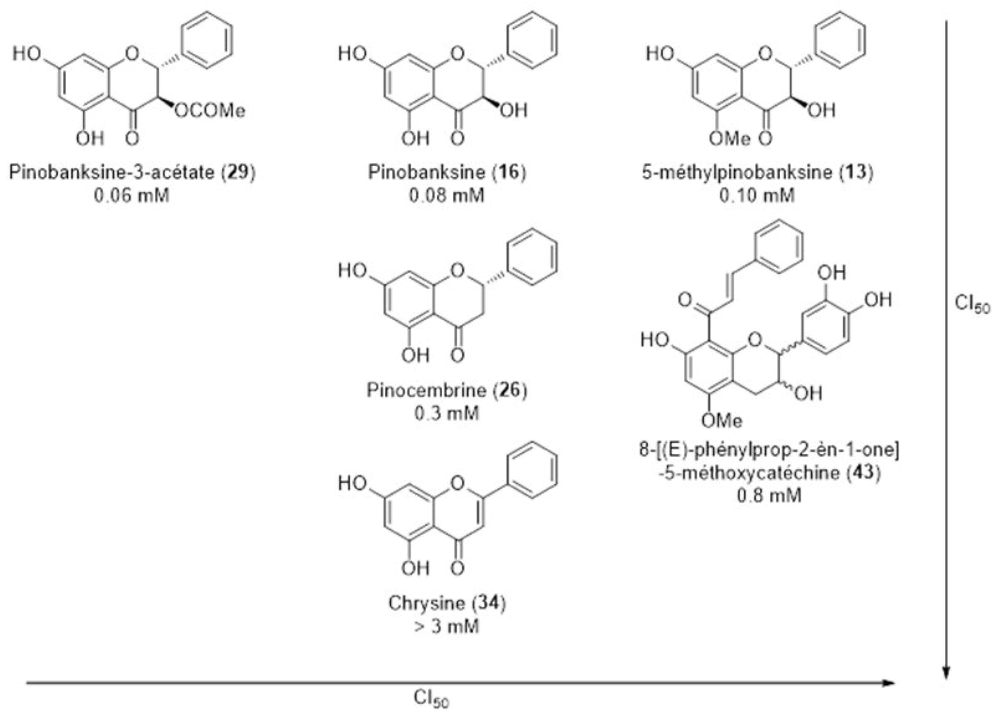


Figure III-22. Comparaison des activités anti-AGEs (Cl₅₀) des différents composés purs analysés

Dans le cas des dérivés d'acide cinnamique, et notamment des dérivés de l'acide caféique, l'activité anti-AGEs est d'autant plus élevée que les fonctions phénols sont méthylées, ce qui semble être corrélé négativement avec l'activité antioxydante²³¹. En effet, l'activité de piégeage des radicaux augmente, on l'a vu précédemment, avec le nombre de groupements phénols libres (surtout en position ortho). L'acide 3,4-diméthoxycinnamique (**11**) est donc plus actif que les acides caféique (**4**), férulique (**8**) et isoférulique (**9**). Les acides *p*-coumarique (**7**) et cinnamique (**14**) sont quant à eux inactifs. En ce qui concerne les esters, dans la même famille des caféates, les Cl_{50} varient de 0.09 pour le caféate de prényle (**30**) (caféate le plus actif) à 1.6 mM pour le CAPE (**33**), c'est donc bien le groupement –OR de l'ester qui semble déterminer l'activité anti-AGEs de la molécule ; ce qui semble être confirmé par la faible différence de Cl_{50} entre le caféate de benzyle (**27**) et le *p*-coumarate de benzyle (**35**). Quant au glycérol, sa forte activité anti-AGEs est probablement due à ses deux groupements *p*-coumarates. Dans le cas des flavonoïdes, ce sont bien, comme on l'a déjà vu, les dihydroflavonols (**13**, **17** et **29**, dérivés de la pinobanksine) qui présentent les meilleures activités devant la pinocembrine (**26**, flavanone) et la chryisine (**34**, flavone). Le composé **43**, dérivé de la catéchine, possède une activité anti-AGEs modérée, sans doute en raison de sa position 8 substituée.

1.3. Conclusion

Plusieurs phénomènes sont impliqués dans le pouvoir inhibiteur de la formation des AGEs :

- **la capacité AO** : certains composés peuvent agir en tant que piègeurs de radicaux libres ou encore en tant que chélateurs de métaux de transition, afin de limiter la formation d'ERO. C'est le cas notamment de certaines classes de flavonoïdes : principalement les flavones et flavonols qui possèdent une double liaison en C2-C3, un hydroxyle en C3, un groupement oxo en C4 mais aussi les dérivés de l'acide caféique avec leurs deux fonctions phénol en *ortho*. Ils interviennent en amont, en prévention de la formation des intermédiaires dicarbonylés I et II (cf. schéma AGEs figure III-12 page 137)
- **La capacité à piéger les composés dicarbonylés** : des composés comme la catéchine, l'épicatéchine et la procyanidine B2 ont montré une forte inhibition de la formation des AGEs en tant qu'agents de piégeage du MGO²³². En effet, ces flavan-3-ols peuvent piéger les intermédiaires dicarbonylés en positions 6 et/ou 8 et ainsi réduire la formation des AGEs^{229,230}. C'est sans doute cette voie d'inhibition de la formation des AGEs qu'empruntent les dérivés de la pinobanksine du fait de leur analogie de structure avec les flavan-3-ols, car on le sait, la pinobanksine-3-acétate (**29**, *i.e.* le composé qui possède l'activité anti-AGEs la plus marquée) ne présente pas d'activité AO DPPH ni les sites de chélation requis pour la complexation avec les MT.

Les extraits organiques de propolis sont donc intéressants en tant qu'inhibiteurs de la glycoxydation, car ils contiennent un mélange des composés antioxydants comme les acides et esters phénoliques principalement et des composés anti-AGEs, notamment les dérivés de la pinobanksine mais aussi certains esters phénoliques. Un test permettant d'évaluer la capacité de piégeage de composés dicarbonylés tels que le méthylglyoxal est actuellement en cours de développement dans notre laboratoire. Les extraits de propolis et ses constituants présentant les meilleures activités anti-AGEs sont en cours d'analyse.

Des composés bioactifs peuvent également bloquer l'interaction entre les AGEs et leur récepteur spécifique (RAGE). Le RAGE est une glycoprotéine de 45 kDa exprimée à la surface de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les lymphocytes, les monocytes, les polynucléaires et les neurones. La fixation des AGEs sur le récepteur RAGE déclenche une signalisation entraînant un stress oxydant intracellulaire et l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire²¹⁵. Mais les AGEs ne sont pas les seuls ligands des RAGE ; d'autres composés déclenchent des voies de signalisation similaires par interaction avec les RAGE comme le peptide β -amyloïde, produit de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), potentiellement impliqué dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer²¹⁵. Il a été récemment montré qu'en inhibant la surexpression des gènes responsable de l'inflammation au niveau des récepteurs RAGE, la pinocembrine (**26**), un des constituants majoritaires des extraits organiques de propolis, a réellement amélioré les fonctions cognitives, préservé la structure du neuropile (partie du tissu nerveux située entre les principales cellules constituant la substance grise du système nerveux central) et diminué la dégénérescence du cortex cérébral chez des souris traitées par le peptide β -amyloïde²³³.

Ainsi, les extraits de propolis représenteraient-ils de très bons supports pour le développement de compléments alimentaires destinés à prévenir la glycoxydation.

Ces travaux sur les activités antioxydantes et anti-AGEs ainsi que sur la composition chimique de la propolis française de Ballot-Flurin ont fait l'objet d'un article dans le "*Journal of Agricultural and Food Chemistry*" publié en janvier 2014²³⁴ (cf. production scientifique page ix).

2. Activités antifongiques et antibactériennes

2.1. Activité antifongique

2.1.1. Souches testées

L'activité antifongique des extraits de propolis BFA a été évaluée sur trois souches fongiques : deux levures (*Candida albicans* et *C. glabrata*) et un champignon filamenteux (*Aspergillus fumigatus*).

Candida albicans est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre. Elle provoque essentiellement des infections, ou candidoses, au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients atteints d'un cancer sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. *C. albicans* est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain. On le retrouve chez 80 % de la population où il n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier. C'est un organisme commensal saprophyte* et opportuniste.

C. glabrata, jusqu'à assez récemment, était considéré chez l'homme comme un organisme commensal non pathogène au niveau des muqueuses. Toutefois, avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, il s'est avéré que *C. glabrata* était un pathogène opportuniste du tractus urogénital. Il se situe au second ou troisième rang comme microorganisme responsable de candidoses superficielles (orales, œsophagiennes, vaginales ou urinaires) et systémiques, qui sont le plus souvent nosocomiales²³⁵.

Aspergillus fumigatus est l'un des champignons saprophytes en suspension dans l'air les plus répandus. Les humains et les animaux inhalent en permanence de nombreuses conidies de ce champignon. Les conidies† sont normalement éliminées chez l'hôte immunocompétent par des mécanismes immunitaires innés ; les seules infections observées chez de tels hôtes étant l'aspergillome et l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique, qui sont des syndromes cliniques rares. Ainsi *A. fumigatus* a-t-il, pendant des années, été considéré comme un pathogène faible. Cependant l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés a entraîné une croissance spectaculaire de l'aspergillose invasive grave et souvent fatale, maintenant reconnue comme l'infection fongique la plus répandue dans le monde entier²³⁶.

* Saprophyte : capable de se nourrir de matière organique non vivante par l'intermédiaire d'une membrane, suite à une réaction enzymatique libérant les nutriments présents dans la matière à ingérer.

† Conidie : spore assurant la multiplication asexuée des champignons mais non capable de mobilité autonome.

2.1.2. Premier test : diffusion solide

Un premier test a tout d'abord été réalisé en milieu solide : un disque imbibé d'extrait (dépôt de 250 µg soit 25 µL d'une solution de 10 mg/mL dans le DMSO) est déposé sur de la gélose sur laquelle pousse une culture de champignons. Après 48h pour *Candida* et 72h pour *Aspergillus*, les résultats sont négatifs, aucune zone d'inhibition n'est observée pour un dépôt de 250 µg. Un autre test sur trois extraits alcooliques (E01-US EtOH 70% et E02-AC et US MeOH) a donc été entrepris en déposant cette fois-ci 500 µg d'extrait au lieu de 250 µg, soit le double en quantité. On note alors un diamètre d'inhibition, pour les deux *Candida*, de 13 à 14 mm (sachant que le disque imbibé a un diamètre de 12 mm). Le témoin, l'amphotéricine B, présente quant à lui un diamètre d'inhibition de 30 mm pour un dépôt de 250 µg. L'activité des extraits n'est pas nulle si on considère que ce sont des extraits et non des molécules pures qui sont testées, mais elle semble assez difficile à évaluer avec cette méthode. Bosio *et al.* l'avaient également constaté et rapportaient que la diffusion solide n'était pas adaptée à la comparaison de différentes souches bactériennes ou propolis car la concentration minimale de propolis permettant la mesure du diamètre d'inhibition était relativement haute et que les solutions de propolis ne diffusaient pas de façon régulière²³⁷.

2.1.3. Activité antifongique des extraits : microdilution

Afin de mieux appréhender cette activité antifongique, nous avons décidé de tester les extraits par microdilution (milieu liquide). Des solutions d'extraits de concentrations décroissantes dans du milieu de culture sont placées en présence des champignons dans une plaque de 96 puits. Après 48 ou 72h, on mesure l'absorbance à 630 nm et on calcule la concentration minimale inhibant 80% (CMI₈₀) de la croissance fongique. Plus la CMI₈₀ est faible, plus l'activité antifongique de l'extrait est importante. Le tableau III-3 donne les CMI₈₀ de six extraits de propolis de Ballot-Flurin, pour *Candida albicans*, *C. glabrata* et pour *Aspergillus fumigatus*.

Tableau III-3. Activité antifongique (CMI₈₀) de six extraits de propolis sur *C. albicans*, *C. glabrata* et *A. fumigatus*

Extraits	CMI ₈₀ (µg/mL)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>A. fumigatus</i>
E01 EtOH 70%	31	31	250
E02 MeOH	31	31	250
E03 EtOH 95%	31	16	250
E04-2 DCM	31	31	250
E06-1 Aq	> 250	> 250	> 250
E08-2 mixte	16	31	250
Amphotéricine B	0.125	0.125	6

Alors que l'extrait aqueux (E06-1 Aq) ne présente pas d'activité antifongique intéressante (> 250 µg/mL) sur les trois souches, les cinq extraits organiques (E01-04 et E08-2), quant à eux, possèdent une CMI₈₀ inférieure ou égale à 31 µg/mL sur les deux *Candida*, ce qui correspond à une activité antifongique significative. En effet, selon les expériences passées, on peut estimer que l'activité antifongique d'un extrait devient intéressante pour une CMI₈₀ inférieure ou égale à 62 µg/mL. Ces mêmes extraits ne possèdent donc qu'une faible activité sur *A. fumigatus* (250 µg/mL). Ces valeurs d'activité antifongique sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec une propolis argentine sur plusieurs espèces de *Candida* (CMI₁₀₀ comprises entre 31 et 125 µg/mL)²³⁸ ou encore que celles de propolis provenant de Grèce et de Chypre (CMI₁₀₀ 20 µg/mL)⁴². Agüero *et al.* ont également montré que les champignons du genre *Aspergillus* n'étaient que peu sensibles aux extraits de propolis³².

2.2. Activité antibactérienne

2.2.1. Souches testées

Nous avons choisi d'évaluer nos extraits de propolis sur un panel représentatif de bactéries Gram(-) et Gram(+) responsables d'infections nosocomiales dans le milieu hospitalier (36 souches).

a) Souches Gram(-)

Acinetobacter baumannii (7 souches) est un germe d'infection opportuniste chez l'Homme, particulièrement chez les personnes immunodéprimées, et qui est à l'origine d'infections variées parfois sévères (infections pulmonaires, septicémies, infections de plaies ou de brûlures...). On le trouve aussi comme agent de maladies nosocomiales et il est résistant aux antibiotiques²³⁹.

Escherichia Coli (2 souches) appelée aussi colibacille, est une bactérie intestinale très commune chez les êtres humains. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, ou encore méningites.

Pseudomonas aeruginosa (3 souches), autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistant, il est de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés). Les formes de pathologie qu'il engendre sont diverses : infection de l'œil, de la peau (plaies : surtout brûlures et plaies opératoires), des urines (surtout après sondages), gastro-intestinales et des poumons (par exemple après bronchoscopie), des méningites d'inoculation, des septicémies comme stade terminal d'infections graves ou complication chez des malades soumis à un traitement immunodépresseur, des leucémies, etc. Le bacille pyocyanique induit facilement des infections

systémiques chez les immunodéprimés (par une chimiothérapie ou par le sida) et chez les victimes de brûlures et de fibrose kystique (mucoviscidose)²³⁹.

Klebsiella oxytoca (1 souche) appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il est responsable d'infections urinaires et septicémies.

Enterobacter cloacae (1 souche) est un pathogène responsable d'infections nosocomiales telles que des bactériémies, des infections pulmonaires, cutanées, urinaires et ophtalmiques.

Enterobacter aerogenes (1 souche) est une bactérie commensale du tube digestif. Elle peut être responsable d'infections urinaires et d'infections nosocomiales. Il existe des problèmes de polyrésistance aux antibiotiques.

Salmonella enteritidis (1 souche) une protéobactérie appartenant elle aussi à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les *salmonella* provoquent des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la toxi-infection alimentaire.

b) Souches Gram(+)

Staphylococcus aureus (13 souches dont des souches résistantes et sensibles), ou staphylocoque doré, est l'espèce la plus pathogène du genre. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections locales suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffes, prothèses cardiaques). *S. aureus* est ainsi responsable de nombreuses infections nosocomiales dans le milieu hospitalier, et certaines souches multirésistantes sont devenues très problématiques ; parmi celles-ci on distinguera le *SARM* (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) qui est en France l'une des souches multirésistantes les plus répandues en milieu hospitalier, les bêta-lactamines étant devenues inefficaces sur cette dernière. On rencontre aussi le *SASM* (*S. aureus* sensible à la méticilline)²³⁹.

Staphylococcus epidermidis (2 souches) se retrouve fréquemment sur la peau et les muqueuses des humains et des animaux. Due à sa facilité de contamination, *S. epidermidis* est probablement l'espèce la plus commune. Bien que *S. epidermidis* soit habituellement non pathogène, c'est une cause importante d'infections chez les patients dont le système immunitaire est compromis ou des patients portant des prothèses ou des cathéters. Ce microbe est responsable d'infections cutanées, d'infections nasales comme des sinusites, d'infections urinaires chez la femme et l'homme. Ces bactéries ont la capacité de produire des biofilms qui leur permettent d'adhérer aux surfaces des prothèses médicales par exemple. Elles sont souvent résistantes à une grande variété d'antibiotiques, y compris la pénicilline et la méticilline.

Enterococcus faecalis (3 souches) et *E. faecium* (1 souche) sont des bactéries commensales habitant le tube digestif et les intestins des humains mais également d'autres mammifères. Elles peuvent causer des endocardites, ainsi que des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme. *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'homme, particulièrement dans un environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité et au risque nosocomial.

Corynebacterium striatum (1 souche) : le terme *corynebacterium* regroupe un ensemble hétérogène (20 genres) de bacilles à Gram positif. Parmi les espèces pathogènes, *Corynebacterium diphtheriae* est le germe toxigène agent de la diphtérie. Les autres espèces sont des bactéries pathogènes opportunistes. Elles sont omniprésentes dans la nature et colonisent la peau et les muqueuses des humains. *C. striatum* a été impliqué dans des cas d'infections pleuropulmonaires chez des personnes immunodéprimées, mais aussi à l'occasion de thrombophlébites, de conjonctivites, de chorioamniotites ou de péritonites²⁴⁰.

2.2.2. Activité antibactérienne des extraits de propolis

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de propolis BFA a donc été réalisée par détermination de la CMI en milieu gélosé. Différentes concentrations d'extraits sont préparées dans de la gélose puis 21 souches peuvent être inoculées en même temps sur une même boîte de Pétri.

Ríos *et al.* estiment qu'un extrait devient intéressant, en termes d'activité antimicrobienne, lorsqu'il exprime une CMI₁₀₀ inférieure ou égale à 100 µg/mL (et 10 µg/mL pour un composé pur)²⁴¹. Dans un premier temps, l'activité des six extraits déjà étudiés pour leur potentiel antifongique a donc été évaluée sur les 28 souches bactériennes décrites, à une concentration de 100 µg/mL. Les résultats sont rassemblés dans le tableau III-4.

Tableau III-4. Activité antibactérienne de six extraits de propolis (100 µg/ mL) sur 28 souches Gram(-) et Gram(+)

N°	Souches bactériennes	Extraits (100 µg/mL)					
		E01	E02	E03	E04-2	E6-1	E08-2
		EtOH 70%	MeOH	EtOH 95%	DCM	H2O	Mixte
Gram(-) :							
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> n°1	-	-	-	-	-	-
2	<i>Acinetobacter baumannii</i> n°2	-	-	-	-	-	-
3	<i>Acinetobacter baumannii</i> n°3	-	-	-	-	-	-
4	<i>Acinetobacter baumannii</i> n°4	-	-	-	-	-	-
5	<i>Acinetobacter baumannii</i> n°5	-	-	-	-	-	-
6	<i>Acinetobacter baumannii</i> n°6	-	-	-	-	-	-
7	<i>Acinetobacter baumannii</i> n°7	-	-	-	-	-	-
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-
9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-
10	<i>Escherichia coli</i> n°1	-	-	-	-	-	-
11	<i>Escherichia coli</i> n°2	-	-	-	-	-	-
12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> n°1	-	-	-	-	-	-
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> n°2	-	-	-	-	-	-
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> n°3	-	-	-	-	-	-
16	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-
Gram(+) :							
17	<i>Corynebacterium striatum</i>	+	+	+	+	-	+
18	<i>Enterococcus faecalis</i> n°1	-	-	-	-	-	-
19	<i>Enterococcus faecalis</i> n°2	-	-	-	-	-	-
20	<i>Enterococcus faecalis</i> n°3	-	-	-	-	-	-
21	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-	-	-
22	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	+	-	+
23	SARM n°1	-	+	-	+	-	+
24	SARM n°2	-	-	-	+	-	+
25	SASM n°1	-	-	-	-	-	-
26	SASM n°2	-	-	-	+	-	+
27	<i>S. epidermidis methiS^a</i>	-	-	-	-	-	-
28	<i>S. epidermidis methiR^b</i>	-	-	-	-	-	-

- : pas d'activité, + : activité antibactérienne, ^a Sensible à la méticilline, ^b Résistant à la méticilline

Ces résultats montrent que les bactéries Gram(-) ne sont pas sensibles aux six extraits de propolis BFA. Par contre, les extraits organiques, à l'exception notable de l'extrait aqueux, sont actifs sur quelques souches Gram(+) *i.e.* *Corynebacterium striatum* (E01-04 et 08-2) et surtout *Staphylococcus aureus*, y compris dans le second cas vis-à-vis de certaines souches résistantes (SARM) ou sensibles (SASM) à la méticilline (E02, E04-2 et E08-2).

Les CMI₁₀₀ ont alors été déterminées pour *Corynebacterium striatum* (souche 17), pour *Staphylococcus aureus* (souche 22) et ses SARM (souches 23 et 24) ainsi que pour les SASM

(souches 25 et 26) mais également pour huit nouvelles souches de SARM et SASM, afin de préciser l'activité sur ces dernières (Tableau III-5).

Tableau III-5. Activité antibactérienne (CMI₁₀₀) des cinq extraits organiques de propolis sur 14 souches Gram(+)

N°	Souches bactériennes	CMI ₁₀₀ (µg/mL)					Oxacilline
		E01 EtOH 70%	E02 MeOH	E03 EtOH 95%	E04-2 DCM	E08-2 mixte	
17	<i>Corynebacterium striatum</i>	90 ± 0	77 ± 12	83 ± 6	63 ± 15	87 ± 21	-
22	<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	90 ± 0	>100	60 ± 10	67 ± 15	≤ 0.25
23	SARM n°1	>100	90 ± 0	>100	57 ± 12	30 ± 0	≥ 4
24	SARM n°2	>100	>100	>100	80 ± 10	77 ± 23	≥ 4
25	SASM n°1	>100	>100	>100	>100	>100	≤ 0.25
26	SASM n°2	>100	>100	>100	87 ± 6	83 ± 29	≤ 0.25
29	SARM n°3	>100	>100	>100	80 ± 0	87 ± 21	≥ 4
30	SARM n°4	>100	>100	>100	77 ± 6	67 ± 23	≥ 4
31	SARM n°5	>100	>100	>100	97 ± 6	>100	≥ 4
32	SARM n°6	>100	>100	>100	77 ± 6	73 ± 29	≥ 4
33	SASM n°3	>100	>100	>100	77 ± 6	73 ± 12	0.25
34	SASM n°4	>100	>100	>100	80 ± 0	97 ± 12	0.5
35	SASM n°5	>100	>100	>100	77 ± 6	90 ± 17	0.5
36	SASM n°6	>100	>100	>100	77 ± 6	90 ± 0	≤ 0.25

Tous les extraits testés présentent une activité significative sur *Corynebacterium striatum* (63-90 µg/mL). Par contre, seuls les extraits DCM et mixte présentent de bonnes activités antibactériennes contre *S. aureus* et les souches SARM et SASM [avec la meilleure activité contre le SARM n°1 pour l'extrait mixte (30 µg/mL)]. Parmi les extraits alcooliques, E02 (MeOH) semble un peu plus actif (90 µg/mL pour *S. aureus* et SARM n°1) que E01 et E03 (EtOH 70 et 95%) qui possède des CMI₁₀₀ supérieures à 100 µg/mL.

Ces valeurs d'activité antibactérienne semblent conformes à celles décrites par Bonheví *et al.* pour des propolis originaires de différentes régions du monde (CMI₁₀₀ de 80 à > 100 µg/mL contre *S. aureus*)²⁴². Mais en ce qui concerne *S. aureus* et les SARM, elles semblent meilleures que celles rapportées pour une propolis française par Grange et Davey (CMI₁₀₀ 188-375 µg/mL)²⁴³. L'activité antibactérienne de nos extraits contre les SARM et les SASM peut être comparée à celle précédemment attribuée à une propolis des îles Salomon, dans le Sud-Ouest de l'océan Pacifique, montrant des CMI₁₀₀ comprises entre 64 et 128 µg/mL¹¹. L'activité de E02 (MeOH) semble par ailleurs plus importante que celle d'un extrait similaire obtenu à partir d'une propolis jordanienne (585 µg/mL contre *S. aureus* et 4.7 mg/mL contre les SARM)⁶⁰.

2.3. Relations composition-activité antimicrobienne

2.3.1. Relation taux de PT et FT-activité antimicrobienne

Dans un premier temps, nous avons comparé les taux de polyphénols totaux et de flavonoïdes avec les activités antimicrobiennes sur les deux souches de *Candida* et sur *S. aureus* (Tableau III-6)

Tableau III-6. Comparaison des taux de polyphénols totaux (PT) et de flavonoïdes totaux (FT= FF+ FD) avec les CMI₈₀ contre *C. albicans* et *glabrata* et la CMI₁₀₀ contre *S. aureus*

Extraits	PT (mg GAE/g)	FT=FF + FD (mg/g)	CMI ₈₀ (µg/mL)		CMI ₁₀₀ (µg/mL)
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. aureus</i>
E01 EtOH 70	246.3 ± 10.6	227.9 ± 9.3	31	31	(>100)
E02 MeOH	238.7 ± 13.3	223.2 ± 5.8	31	31	90 ± 0
E03 EtOH 95	253.6 ± 5.1	220.1 ± 3.6	31	16	(> 100)
E04-2 DCM	273.5 ± 6.8	254.6 ± 10.3	31	31	60 ± 10
E05-1 Aq	279.5 ± 22.4	97.1 ± 7.8	> 250	> 250	> 100
E08-2 mixte	281.0 ± 7.1	236.0 ± 10.3	16	31	67 ± 15

Ces résultats suggèrent que les activités antifongiques et antimicrobiennes des extraits de propolis BFA peuvent être reliées à des taux de PT et FT élevés. En effet, alors que tous les extraits ont un fort taux de PT, seuls ceux qui présentent de plus un taux de FT élevé sont actifs sur les souches étudiées. Autrement dit, bien que l'extrait aqueux présente un fort taux de PT, son faible taux de FT entraîne une inactivité sur les souches fongiques et bactériennes. *A contrario* plus les taux de PT et de FT sont élevés et plus la CMI₁₀₀ apparaît faible. C'est le cas ici pour les extraits E04-2 DCM et E08-2 mixte. C'est ce qu'ont également montré Velasquez *et al.*, à partir d'EEP provenant de trois régions urbanisées (Ures, Caborca et Pueblo de Alamos) de l'état du Sonora au Mexique. Ces échantillons présentaient respectivement des taux de FT de 410, 332 et 209 mg/g avec des CMI₁₀₀ de 100, 200 et > 400 µg/mL⁴⁵.

2.3.2. Relation taux cumulé des 12 marqueurs-activité antimicrobienne

Dans un second temps, nous avons comparé les activités antifongiques et antibactériennes des six extraits de propolis BFA avec le taux cumulé des 12 marqueurs associé à chaque extrait (*cf.* tableau II-7 du chapitre II, section 5.3.1 c page 105). Les extraits E04-2 DCM et E08-2 mixte, qui présentent les meilleures activités antibactériennes contre *S. aureus* (et ses SARM et SASM) possèdent également les taux cumulés des 12 marqueurs les plus élevés.

2.3.3. Activités antimicrobiennes des cinq constituants majoritaires

Les cinq composés majoritaires des extraits actifs, parmi les douze quantifiés, sont par ordre décroissant : la pinobanksine-3-acétate (**29**), la pinocembrine (**26**), la chrysin (**34**), la galangine (**35**) et le caféate de prényle (**30**) (*cf.* tableau II-7 page 105). Ainsi, les activités antifongiques (*C.*

albicans et *glabrata* et *A. fumigatus*) et antibactériennes (*S. aureus*, 2 SARM et 2 SASM) ont-elles été individuellement déterminées pour ces cinq composés majoritaires (Tableau III-7).

Tableau III-7. Activités antifongiques et antibactériennes des cinq composés majoritaires des extraits organiques de propolis BFA

Souches antifongiques	Composé / CMI ₈₀ (µg/mL)					
	Pinobanksine-3-acétate (29)	Pinocebrine (26)	Chryisine (34)	Galangine (35)	Caféate de prényle (30)	Amphotéricine B
<i>C. albicans</i>	250	62	> 250	> 250	62	0.125
<i>C. glabrata</i>	250	125	> 250	> 250	16	0.125
<i>A. fumigatus</i>	> 250	250	> 250	> 250	125	6
Souches anti-N° bactériennes	Composé / CMI ₁₀₀ (µg/mL)					
	Pinobanksine-3-acétate (29)	Pinocebrine (26)	Chryisine (34)	Galangine (35)	Caféate de prényle (30)	Oxacilline
22 <i>S. aureus</i>	> 100	100 ± 0	> 100	> 100	63 ± 6	≤ 0.25
23 SARM n°1	> 100	> 100	> 100	> 100	70 ± 0	≥ 4
24 SARM n°2	> 100	> 100	> 100	> 100	70 ± 0	≥ 4
25 SASM n°1	> 100	> 100	> 100	> 100	93 ± 6	≤ 0.25
26 SASM n°2	> 100	> 100	> 100	> 100	93 ± 6	≤ 0.25

La pinobanksine-3-acétate (29), la chryisine (34) et la galangine (35) ne sont pas actives sur les trois souches fongiques (CMI₈₀ ≥ 250 µg/mL) ni sur les cinq souches de staphylocoques (CMI₁₀₀ > 100 µg/mL). La pinocebrine (26) montre une activité modérée sur *C. albicans* et *glabrata* (CMI₈₀ 62-125 µg/mL) et sur *S. aureus*. Le caféate de prényle (30) est le composé qui possède les meilleures activités : jusqu'à 16 µg/mL contre *C. glabrata* et jusqu'à 63 µg/mL contre *S. aureus*. Même si le caféate de prényle montre les CMI les plus faibles parmi les cinq composés majoritaires, ces derniers, pris individuellement, ne semblent pas aussi actifs que les extraits organiques (CMI₁₀₀ 30-100 µg/mL). Dans la même optique et dans le cas de l'extrait méthanolique d'une propolis jordanienne, Darwish *et al.* ont évalué l'activité antibactérienne de trois composés-types : la pinobanksine-3-acétate, la pinocebrine et la chryisine, qui se sont révélés être les composés les plus actifs (CMI₁₀₀ aux alentours de 250 µg/mL), sur *S. aureus* et une souche SARM⁶⁰. Les auteurs s'attendaient en réalité à mesurer des activités beaucoup plus importantes pour des composés purs, ce qui suggère que l'activité antibactérienne de la propolis est certainement due à une interaction synergique de ces constituants.

2.4. Effets synergiques des constituants de la propolis

Ces précédents résultats sont en accord avec ceux de Kujumgiev *et al.*, pour lesquels un seul constituant ou une seule famille de constituants ne peuvent à eux seuls expliquer l'activité

antibactérienne d'une propolis. Les combinaisons de composés, qui agissent de façon synergique, observées dans ce type de mélanges complexes, sont donc essentielles pour leurs propriétés biologiques¹². Kujumgiev relève aussi qu'à ce jour, aucune recherche sur l'activité antibactérienne des propolis, ne peut démontrer qu'un seul constituant posséderait une activité supérieure à celle de l'extrait total^{12,244}. Malheureusement, tous les constituants de la propolis BFA n'ont pu être testés individuellement car cela aurait demandé beaucoup de temps et de manipulations. Par contre, les activités antifongiques et antibactériennes d'un des deux composés nouveaux identifiés (l'autre s'étant dégradé), la 8-[(E)-phénylprop-2-èn-1-one]-5-méthoxycatéchine (**43**), ont été évaluées. Les résultats sont donnés dans le tableau III-8.

Tableau III-8. Activités antifongiques et antibactériennes du composé nouveau 43

Activité antifongique		Activité antibactérienne		
Souches	CMI ₈₀ (µg/mL)	N° Souches	CMI ₁₀₀ (µg/mL)	
<i>C. albicans</i>	> 250	22	<i>S. aureus</i>	> 100
<i>C. glabrata</i>	> 250	23	MRSA n°1	≤ 10
<i>A. fumigatus</i>	> 250	24	MRSA n°2	≤ 10
		25	MSSA n°1	> 100
		26	MSSA n°2	> 100

Le dérivé de la catéchine (**43**) ne présente pas d'activité sur les trois souches fongiques étudiées. Et alors qu'il n'est pas actif sur la souche standard de *S. aureus* et ses SASM, sa CMI₁₀₀ (≤ 10 µg/mL) est particulièrement faible sur les souches résistantes, ce qui représente une activité très intéressante. Cependant, ce composé étant présent en assez faible quantité dans la propolis (0.6 mg/g), il semble donc beaucoup plus important de se focaliser sur l'extrait de propolis dans sa globalité, qui de plus est assez facile à obtenir.

Le mécanisme de l'activité antimicrobienne de la propolis est complexe et peut être attribué, on l'a déjà vu, à l'effet synergique de ses différents constituants actifs comme les composés phénoliques et les flavonoïdes^{17,61,245}. En effet, ces composés auraient la capacité d'augmenter la perméabilité de la membrane et d'inhiber la mobilité des bactéries, ce qui contribuerait à l'action antibactérienne de la propolis et à son synergisme avec les antibiotiques²⁴⁶. Une étude réalisée par AL-Waili *et al.* a même montré que la propolis et le miel avaient des effets synergiques sur une seule souche microbienne (par exemple *C. albicans*) mais aussi sur un mélange de plusieurs souches (*C. albicans* + *S. aureus* + *E. Coli*)²⁴⁷. D'autres études *in vitro* confirment le synergisme entre la propolis et les antibiotiques : Krol *et al.* ont décrit un effet synergique entre la propolis et les antibiotiques sur la croissance de *S. aureus*, mais qui était significative uniquement à une concentration de 600 µg/mL²⁴⁵. Une autre étude indique que la CMI de 15 propolis différentes pour *S. aureus* et *S. subtilis* se situait plutôt entre 80 et

200 µg/mL²⁴², cette dernière valeur étant également décrite dans l'étude de Wojtyczka *et al.*²⁴⁸. Stepanovic *et al.* ont montré qu'il existait des actions antimicrobiennes synergiques de la propolis avec l'ampicilline, la ceftriaxone et la doxycycline contre *S. aureus* et avec la nystatine contre *C. albicans*, et que la résistance des souches bactériennes aux antibiotiques n'avait pas d'influence sur leur sensibilité vis-à-vis de l'extrait de propolis¹⁴⁴. Des études de synergisme *in vitro*, menées par Fernandes Junior¹⁴³, ont révélé des effets synergiques des EEP avec le chloramphénicol, la gentamicine, la netilmicine, la tétracycline, la vancomycine et la clindamycine.

2.5. Conclusion

Ces résultats sont très importants car la résistance aux antibiotiques est progressivement devenue l'un des problèmes majeurs de santé publique du 21^{ème} siècle²⁴⁹. La résistance concerne des antibiotiques aussi bien utilisés dans le traitement d'infections bactériennes et fongiques que virales. Une très large variété de mécanismes biochimiques et physiologiques peut être à l'origine de cette résistance. Récemment, une base de donnée (ARDB pour Antibiotic Resistance Genes Database) a révélé l'existence de plus de 20 000 gènes potentiellement "résistants", provenant de près de 400 types différents²⁵⁰. De très nombreux pathogènes deviennent donc résistants aux antibiotiques, aussi bien chez les germes Gram(+) que Gram(-). Ainsi la résistance aux antibiotiques continue-t-elle d'augmenter alors que le développement de nouveaux agents antibiotiques, lui, ralenti. Mais devant l'ampleur de ce problème, plusieurs campagnes multinationales ont abouti à des recommandations politiques et ont amorcé un important débat dans le but de stimuler le développement de nouveaux médicaments antibactériens et de nouvelles technologies, ce qui a abouti à une intense coopération entre les Etats-Unis et l'Union Européenne (UE), qui ont annoncé en 2011 leur "Plan d'action contre les menaces croissantes de la résistance microbienne" qui ne cesse de prendre de l'ampleur au sein de l'UE. La Commission Européenne est même à l'origine d'une approche sans précédent, qui consiste à conduire la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques en impliquant les industries pharmaceutiques, les laboratoires de recherche des universités et les petites entreprises soutenues par les fonds publics au moyen de subventions²⁵¹.

Les extraits DCM et mixte de propolis BFA, présentant de bonnes activités antibactériennes contre *S. aureus* et plusieurs de ses souches résistantes et sensibles à la méticilline (CMI₁₀₀ 30-100 mg/mL), possèderaient un réel potentiel dans la lutte des infections à staphylocoques. Malheureusement, le DCM est peu adapté à un usage thérapeutique. Nous nous attendions à ce que les extraits éthanoliques soient dotés d'une activité contre *S. aureus* semblable à celle des extraits DCM et mixte (comme pour les levures *Candida*), mais ce n'est pas le cas (CMI₁₀₀ > 100 mg/mL). Il conviendrait donc de développer des extractions alternatives, par des solvants non toxiques et

écologiques, permettant d'obtenir des extraits de composition similaire à celle des extraits à base de DCM.

Un article sur les activités antifongiques et antibactériennes de la propolis française de Ballot-Flurin, destiné au journal "*Evidence-based Complementary and alternative Medicine*" (eCAM) est en préparation.

3. Partie expérimentale

3.1. Réactifs

Le 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), l'albumine de sérum bovin (BSA, fraction V), le phosphate de potassium monobasique, le phosphate de potassium dibasique trihydraté, l'azoture de sodium, l'aminoguanidine hydrochloride, le milieu RPMI-1640, l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS) et la glutamine, tous de pureté analytique, ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Le 2,2'-Azobis (2-méthylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), la fluorescéine (FL), l'acide 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique (Trolox®), l'acide 5'-cafféoylquinique (acide chlorogénique) proviennent d'Acros Organics (Geel, Belgium) et le ribose vient de chez Alfa Aesar (Schiltigheim, France). Le milieu gélosé (Mueller Hinton agar) provient de Merk (Allemagne).

3.2. Activité antioxydante

3.2.1. Méthode DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de propolis par le diphénylpicrylhydrazyle (DPPH) a été effectuée en utilisant une méthodologie décrite par Abdel-Lateff *et al.*²⁵², légèrement modifiée. Les extraits ou les composés à tester ainsi que les standards sont dilués dans l'éthanol absolu à une concentration de 0.02 mg/mL à partir de solutions mères à 1 mg/mL dans le DMSO. 100 µL des solutions diluées sont placés dans des plaques à 96 puits en triple exemplaires. La réaction est alors initiée par addition de 25 µL d'une solution de DPPH fraîchement préparée (1 mM) et de 75 µL d'EtOH absolu en utilisant l'injecteur du lecteur de microplaques (Infinite® 200, Tecan, France) de façon à obtenir un volume final de 200 µL par puits. Au bout de 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'EtOH est utilisé comme blanc et des solutions de Trolox (analogue hydrophile de l' α -tocophérol) de 10, 25, 50, et 75 µM sont utilisées pour l'établissement de la droite d'étalonnage. Des solutions éthanoliques d'acide chlorogénique (56.5 µM) et d'extrait de romarin (0.02 mg/mL) sont utilisées comme standards de contrôle qualité. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalents Trolox (micromoles de TE par gramme d'extrait).

3.2.2. Méthode ORAC

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode ORAC a été réalisée selon la méthode décrite par Huang *et al.*²⁵³ avec quelques modifications. Le dosage a été réalisé dans une microplaque de 96 puits. Le mélange réactionnel contenait 100 μL de tampon phosphate à 75 mM (pH 7.4), 100 μL d'une solution de fluorescéine fraîchement préparée à 0.1 mM dans du tampon phosphate, 50 μL d'une solution de 2,2'-azobis(2-méthylpropionamide) dichlorhydrate (AAPH) fraîchement préparée (51.6 mg/mL dans du tampon phosphate) et 20 μL d'échantillon par puits. Les échantillons sont analysés en triple exemplaires et dilués dans le tampon phosphate à différentes concentrations (25, 12.5, 6.25 et 3.12 mg/mL) à partir de solutions mères à 1 mg/mL dans le DMSO. La fluorescéine, le tampon phosphate et les échantillons ont été pré-incubés à 37°C pendant 10 min. La réaction est déclenchée par l'ajout de l'AAPH en utilisant l'injecteur du lecteur de microplaques (Infini[®] 200, Tecan, France). La fluorescence est mesurée et enregistrée pendant 40 minutes (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 520 nm). Le tampon phosphate à 75 mM est utilisé comme blanc et des solutions de Trolox de 12.5, 25, 50 et 75 μM sont utilisées pour l'établissement de la droite d'étalonnage. Des solutions d'acide chlorogénique (8.8 μM) et d'extrait de romarin (12.5 $\mu\text{g/mL}$) dans du tampon phosphate ont été utilisées comme standards de contrôle de qualité. Les valeurs ORAC finales ont été calculées en utilisant une équation de régression entre la concentration de Trolox et l'aire nette sous courbe de décroissance de la fluorescéine et ont été exprimées en micromole d'équivalents Trolox par gramme de matière sèche. Les aires sous courbes ont été calculées en utilisant le logiciel d'analyse de données Magellan[™] (Tecan, France).

3.3. Activité anti-AGEs

Les concentrations inhibant 50% (CI_{50}) de la formation des AGEs sont déterminées en utilisant la méthode déjà décrite au laboratoire²¹⁹ en y apportant quelques modifications. Brièvement, l'albumine de sérum bovin (BSA) (10 mg/mL) est mise à incuber avec du D-ribose (0.5 M) et l'extrait (1 μg à 1 mg) ou le composé à tester (3 μM à 3 mM) dans du tampon phosphate (50 mM) à pH 7.4 (NaN_3 , 0.02%). Les solutions sont incubées à 37°C pendant 24h directement dans des microplaques de 96 puits fermées hermétiquement avant mesure de la fluorescence des AGEs. La fluorescence provenant de l'incubation, dans les mêmes conditions, entre la BSA (10 mg/mL) et l'extrait (1 μg à 1 mg) ou le composé à tester (3 μM à 3 mM), est soustraite pour chaque mesure. Un contrôle, c'est-à-dire sans inhibition de la formation des AGEs, consiste en un mélange contenant la BSA (10 mg/mL) et le D-ribose (0.5 M). Un blanc, c'est-à-dire 100% de l'inhibition de la formation des AGEs, consiste en de la BSA seule. Le volume final par puits est de 100 μL . La fluorescence des AGEs est mesurée aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la pentosidine (λ_{exc} 335 nm, λ_{em} 385 nm) grâce à un spectrofluorimètre lecteur de microplaques. Dans le cadre de cette automatisation, une seule

analyse est suffisante pour une détermination précise de la CI_{50} ^{218,219}. Le pourcentage de formation des AGEs est calculé selon la formule suivante pour chaque concentration d'extrait/composé :

$$AGEs (\%) = \frac{\text{fluorescence (échantillon)} - \text{fluorescence (blanc/échantillon)}}{\text{fluorescence (contrôle)} - \text{fluorescence (blanc/contrôle)}} \times 100$$

La courbe sigmoïde "dose-effet" a été établie grâce au logiciel Sigma Plot 12.0, permettant ainsi le calcul des valeurs de CI_{50} .

3.4. Activité antifongique

L'activité antifongique a été évaluée sur des champignons pathogènes pour l'homme : deux levures communes (*Candida albicans* ATCC 66396 et *C. glabrata* LMA 90-1085) et un champignon filamenteux (*Aspergillus fumigatus* CBS 11326). Ces souches fongiques ont été obtenues aux laboratoires de parasitologie et de mycologie, au Centre Universitaire Hospitalier d'Angers. Les microorganismes ont été cultivés à 37 °C dans du milieu YPDA (yeast extract-peptone-dextrose-agar) contenant 0.5 g/L de chloramphénicol pendant deux (pour *C. albicans* et *glabrata*) ou trois jours (*A. fumigatus*). Les tests ont été réalisés selon la procédure décrite par Alomar *et al.*²⁵⁴, en suivant les directives des méthodes de référence approuvées par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) pour les levures²⁵⁵ et champignons filamenteux²⁵⁶. Brièvement, les suspensions des deux *Candida* et d'*A. fumigatus* dans l'eau distillée sont respectivement centrifugées et filtrés puis ajustées à une densité optique de 0.06 à 0.1 à 630 nm). Elles sont ensuite introduites (1/1000 dans le cas des levures et 1/10 dans le cas d'*A. fumigatus*) dans du milieu de culture préparé avec 10 mL de milieu RPMI-1640, 10 mL de MOPS (aliquoté), 1 mL de glutamine (aliquoté) et 79 mL d'eau distillée. Les tests antifongiques ont été réalisés dans des microplaques de 96 puits. Les échantillons à tester sont tout d'abord dilués deux fois en cascade dans le DMSO et 5 µL de chaque solution est déposé en triplicat dans les puits de façon à obtenir des concentrations finales de 250 à 1.95 µg/mL. Un contrôle stérile permet de vérifier que le milieu RPMI stérile n'a pas été contaminé. Un contrôle contaminé consiste en le milieu RPMI contaminé par la levure ou le champignon seuls. Un contrôle précipitation correspond à la solution d'échantillon dans le milieu RPMI stérile. Le plan de la microplaque est détaillé dans la figure III-23.

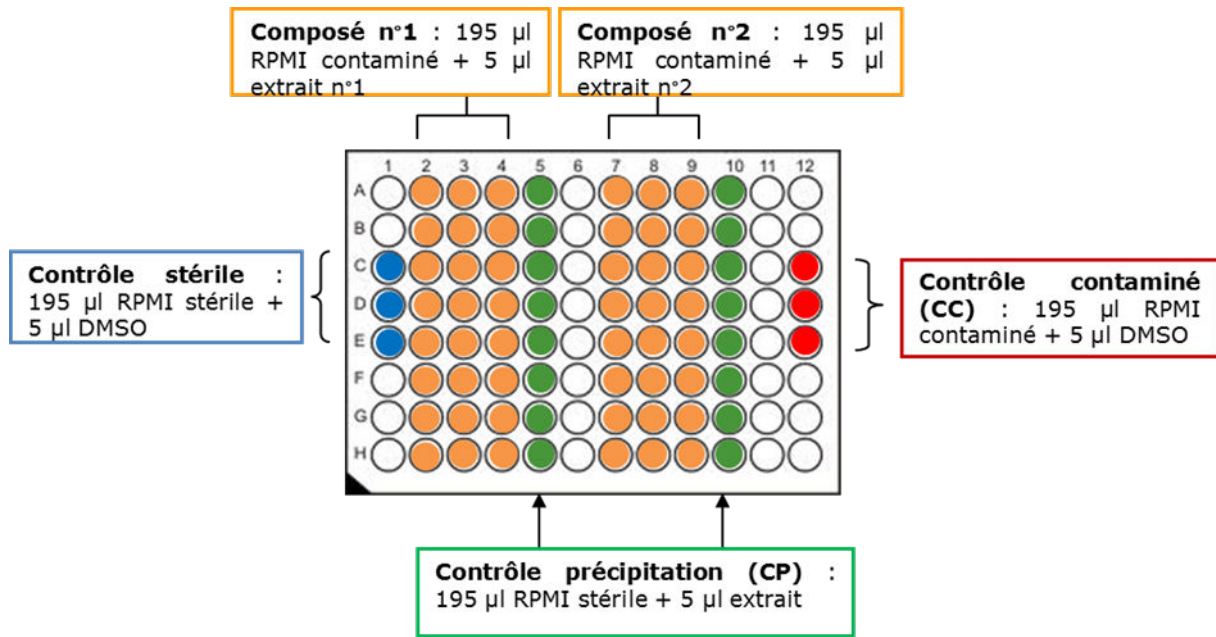


Figure III-23. Plan de la microplaque du test antifongique (microdilution)

Après 48h à 37°C pour *C. albicans* et *glabrata*, et 72h pour *A. fumigatus*, la concentration minimale inhibant 80% (CMI₈₀) de la croissance fongique correspond à la plus faible concentration

$$\text{pour } CF = \frac{\text{moyenne } DO(\text{Composé}) - DO(\text{CP})}{\text{moyenne } DO(\text{CC})} \times 100 \leq 20 (\%)$$

Où CF : croissance fongique

DO : densité optique

CP : contrôle précipité

CC : contrôle contaminé

L'amphotéricine B a été utilisée comme témoin de référence.

3.5. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été évaluée sur 36 souches bactériennes pathogènes pour l'homme (laboratoire de bactériologie, CHU d'Angers) : sept souches d'*Acinetobacter baumannii* (RCH, SAN008, 12, AYE, CIP7034, CIP107292 et CIP5377), deux souches d'*Escherichia coli* (ATCC25922 et un isolat clinique 0705A0434), trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853 et deux isolats cliniques 0704C0134 et 0703C0259), ainsi que quatre isolats cliniques d'*Enterobacter cloacae* (0705A1743), *E. aerogenes* (0705A0867), *Klebsiella oxytoca* (0705C0187) et *Salmonella enteritidis* (phage type 4) pour les bactéries gram(-); treize souches de *Staphylococcus aureus* [ATCC25923, six SARM (n°1 0706C0025, n°2 0702E0196, n°3 11004533801, n°4 11004691801, n°5 11004787401, n°6 11006153901) et six SASM (n°1 0703H0036, n°2 0701A0095, n°3 11004327701, n°4 11004480701, n°5 11004691801, n°6 11004010401), deux isolats cliniques de *S. epidermidis* [*methiS* (12004523201) et *methiR* (12552599902)], trois isolats cliniques d'*Enterococcus faecalis*

(11003508001, 11003492701 et 11004774001) et un d'*E. faecium* (11502441401), et enfin un isolat clinique de *Corynebacterium striatum* (56) pour les bactéries gram(+).

Les tests ont été réalisés selon la méthode décrite par Alomar *et al.*²⁵⁷ avec quelques modifications. Dans un premier temps, des solutions mères de chaque échantillon (extrait ou composé pur) sont préparées à une concentration de 20 mg/mL dans du DMSO dans des conditions stériles. Puis selon la concentration à tester, on ajoute le volume correspondant dans 20 mL de milieu gélosé Mueller-Hinton en surfusion à 55°C environ. Par exemple, pour tester une concentration de 70 µg/mL, il faut ajouter 70 µL de la solution mère à 20 mg/mL dans 20 mL de milieu gélosé. Le mélange est alors placé dans des boîtes de Pétri et mis à refroidir. Dans un second temps, les souches bactériennes sont préparées à l'inoclic (dilution d'une colonie dans l'eau). Pour les staphylocoques, on met les souches en suspension dans une solution saline (0.15 M) de façon à obtenir une solution de densité optique de 1.1 MF (Mac Ferlan, mesure de turbidité) qui sera diluée au dixième. 21 souches peuvent être inoculées en même temps par dépôt (10 µL) sur la surface des géloses contenant des extraits ou composés, grâce à un inoculateur multipoint (AQS, Angleterre) (Figure III-24). Des boîtes témoins ne contenant pas d'échantillon sont égalementensemencées en début et en fin d'inoculation, et entre chaque extrait ou composé.

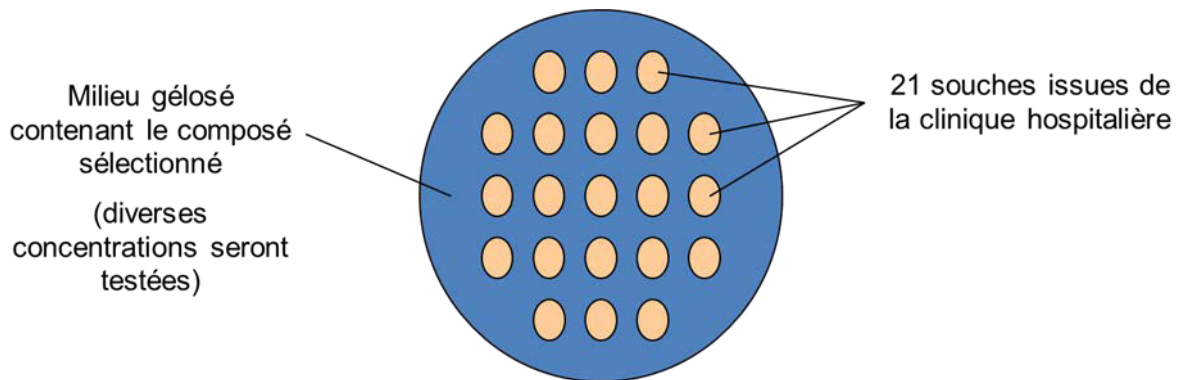


Figure III-24. Schéma d'une boîte de Pétri servant à l'évaluation microbiologique d'extraits ou de composés

Après 24h d'incubation à 37°C, la concentration minimum d'inhibition (CMI_{100} , µg/mL) de chaque échantillon contre les souches bactériennes est déterminée, elle correspond à la première concentration où aucune pousse n'est observée. L'oxacilline est utilisée pour distinguer des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM : $CMI_{100} \leq 0.25$ µg/mL) des souches sensibles (SASM : $CMI_{100} \geq 4$ µg/mL).

Bibliographie du chapitre III (203-257)

- (203) Almela, L.; Sánchez-Muñoz, B.; Fernández-López, J. A.; Roca, M. J.; Rabe, V. Liquid Chromatographic–mass Spectrometric Analysis of Phenolics and Free Radical Scavenging Activity of Rosemary Extract from Different Raw Material. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1120*, 221–229.
- (204) Buratti, S.; Benedetti, S.; Cosio, M. S. Evaluation of the Antioxidant Power of Honey, Propolis and Royal Jelly by Amperometric Flow Injection Analysis. *Talanta* **2007**, *71*, 1387–1392.
- (205) Teixeira, E. W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A.; Stringheta, P. C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2010**, *7*, 307–315.
- (206) Dangles, O. Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16*, 692–714.
- (207) Kawashima, T.; Manda, S.; Uto, Y.; Ohkubo, K.; Hori, H.; Matsumoto, K.; Fukuhara, K.; Ikota, N.; Fukuzumi, S.; Ozawa, T.; Anzai, K.; Nakanishi, I. Kinetics and Mechanism for the Scavenging Reaction of the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical by Synthetic Artepillin C Analogues. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2012**, *85*, 877–883.
- (208) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, *20*, 933–956.
- (209) Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352.
- (210) Patil, C. B.; Mahajan, S. K.; Katti, S. A. Chalcone: A Versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2009**, *1*, 11–22.
- (211) Takeuchi, M.; Yamagishi, S. Possible Involvement of Advanced Glycation End-Products (AGEs) in the Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 973–978.
- (212) Ahmed, N. Advanced Glycation Endproducts—role in Pathology of Diabetic Complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2005**, *67*, 3–21.
- (213) Jandeleit-Dahm, K.; Cooper, M. E. The Role of AGEs in Cardiovascular Disease. *Current pharmaceutical design* **2008**, *14*, 979–986.
- (214) Miyata, T.; Iida, Y.; Horie, K.; Cai, Z.; Sugiyama, S.; Maeda, K. Pathophysiology of Advanced Glycation End-Products in Renal Failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* **1996**, *11*, 27–30.
- (215) Gillery, P. Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré. *Annales de Biologie Clinique* **2006**, *64*, 309–314.
- (216) Sero, L.; Calard, F.; Sanguinet, L.; Levillain, E.; Richomme, P.; Séraphin, D.; Derbre, S. Synthesis and Evaluation of Naphthoic Acid Derivatives as Fluorescent Probes to Screen Advanced Glycation End-Products Breakers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 6716–6720.
- (217) Yoo, N. H.; Jang, D. S.; Yoo, J. L.; Lee, Y. M.; Kim, Y. S.; Cho, J.-H.; Kim, J. S. Erigeronflavanone, a Flavanone Derivative from the Flowers of *Erigeron Annuus* with Protein Glycation and Aldose Reductase Inhibitory Activity. *Journal of Natural Products* **2008**, *71*, 713–715.
- (218) Derbré, S.; Gatto, J.; Pelleray, A.; Coulon, L.; Séraphin, D.; Richomme, P. Automating a 96-Well Microtiter Plate Assay for Identification of AGEs Inhibitors or Inducers: Application to the Screening of a Small Natural Compounds Library. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 1747–1758.
- (219) Séro, L.; Sanguinet, L.; Blanchard, P.; Dang, B. T.; Morel, S.; Richomme, P.; Séraphin, D.; Derbré, S. Tuning a 96-Well Microtiter Plate Fluorescence-Based Assay to Identify AGE Inhibitors in Crude Plant Extracts. *Molecules* **2013**, *18*, 14320–14339.

- (220) Vinson, J. A.; Howard III, T. B. Inhibition of Protein Glycation and Advanced Glycation End Products by Ascorbic Acid and Other Vitamins and Nutrients. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **1996**, *7*, 659–663.
- (221) Bruneton, J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*; Éd. Tec & doc; Éd. médicales internationales: Paris; Cachan, 2009.
- (222) Thornalley, P. J. Use of Aminoguanidine (Pimagedine) to Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Archives of biochemistry and biophysics* **2003**, *419*, 31–40.
- (223) Lou, H.; Yuan, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Oka, S. Alkaloids and Flavonoids from Peanut Skins. *Planta Medica* **2001**, *67*, 345–349.
- (224) Nakagawa, T.; Yokozawa, T.; Terasawa, K.; Shu, S.; Juneja, L. R. Protective Activity of Green Tea against Free Radical- and Glucose-Mediated Protein Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 2418–2422.
- (225) Matsuda, H.; Wang, T.; Managi, H.; Yoshikawa, M. Structural Requirements of Flavonoids for Inhibition of Protein Glycation and Radical Scavenging Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 5317–5323.
- (226) Porfirio, D. A.; Ferreira, R. de Q.; Malagutti, A. R.; Valle, E. M. A. Electrochemical Study of the Increased Antioxidant Capacity of Flavonoids through Complexation with iron(II) Ions. *Electrochimica Acta* **2014**, *141*, 33–38.
- (227) Říha, M.; Karlíčková, J.; Filipský, T.; Macáková, K.; Rocha, L.; Bovicelli, P.; Silvestri, I. P.; Saso, L.; Jahodář, L.; Hrdina, R.; Mladěnka, P. In Vitro Evaluation of Copper-Chelating Properties of Flavonoids. *RSC Advances* **2014**, *4*, 32628.
- (228) Fan, G.-J.; Jin, X.-L.; Qian, Y.-P.; Wang, Q.; Yang, R.-T.; Dai, F.; Tang, J.-J.; Shang, Y.-J.; Cheng, L.-X.; Yang, J.; Zhou, B. Hydroxycinnamic Acids as DNA-Cleaving Agents in the Presence of Cull Ions: Mechanism, Structure–Activity Relationship, and Biological Implications. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15*, 12889–12899.
- (229) Lo, C.-Y.; Li, S.; Tan, D.; Pan, M.-H.; Sang, S.; Ho, C.-T. Trapping Reactions of Reactive Carbonyl Species with Tea Polyphenols in Simulated Physiological Conditions. *Molecular Nutrition & Food Research* **2006**, *50*, 1118–1128.
- (230) Sang, S.; Shao, X.; Bai, N.; Lo, C.-Y.; Yang, C. S.; Ho, C.-T. Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate: A New Trapping Agent of Reactive Dicarbonyl Species. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *20*, 1862–1870.
- (231) Tsimidou, M. Z.; Nenadis, N.; Zhang HongYu. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Natural Antioxidant Phenols* **2006**, 29–67.
- (232) Peng, X.; Cheng, K.-W.; Ma, J.; Chen, B.; Ho, C.-T.; Lo, C.; Chen, F.; Wang, M. Cinnamon Bark Proanthocyanidins as Reactive Carbonyl Scavengers To Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 1907–1911.
- (233) Liu, R.; Wu, C.; Zhou, D.; Yang, F.; Tian, S.; Zhang, L.; Zhang, T.; Du, G. Pinocembrin Protects against B-Amyloid-Induced Toxicity in Neurons through Inhibiting Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-Independent Signaling Pathways and Regulating Mitochondrion-Mediated Apoptosis. *BMC Medicine* **2012**, *10*, 105.
- (234) Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Gatto, J.; Aumond, M.-C.; Blanchard, P.; Derbré, S.; Flurin, C.; Richomme, P. Chemical Composition, Antioxidant and Anti-AGEs Activities of a French Poplar Type Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 1344–1351.
- (235) Fidel, P. L.; Vazquez, J. A.; Sobel, J. D. Candida Glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. Albicans. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 80–96.
- (236) Latgé, J.-P. Aspergillus Fumigatus and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 310–350.
- (237) Bosio, K.; Avanzini, C.; D'avolio, A.; Ozino, O.; Savoia, D. In Vitro Activity of Propolis against Streptococcus Pyogenes. *Letters in Applied Microbiology* **2000**, *31*, 174–177.
- (238) Agüero, M. B.; Svetaz, L.; Sánchez, M.; Luna, L.; Lima, B.; López, M. L.; Zacchino, S.; Palermo, J.; Wunderlin, D.; Feresin, G. E.; Tapia, A. Argentinean Andean Propolis Associated with the Medicinal Plant Larrea Nitida Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS

- Characterization and Antifungal Activity. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 1970–1978.
- (239) Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2013**, *11*, 297–308.
- (240) Watkins, D. A.; Chahine, A.; Creger, R. J.; Jacobs, M. R.; Lazarus, H. M. *Corynebacterium Striatum*: A Diphtheroid with Pathogenic Potential. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **1993**, *17*, 21–25.
- (241) Ríos, J. L.; Recio, M. C. Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *100*, 80–84.
- (242) Bonvehí, J. S.; Coll, F. V.; Jordà, R. E. The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1994**, *71*, 529–532.
- (243) Grange, J. M.; Davey, R. W. Antibacterial Properties of Propolis (bee Glue). *Journal of the Royal Society of Medicine* **1990**, *83*, 159–160.
- (244) Kujumgiev, A.; Bankova, V.; Ignatova, A.; Popov, S. Antibacterial Activity of Propolis, Some of Its Components and Their Analogs. *Die Pharmazie* **1993**, *48*, 785–786.
- (245) Krol, W.; Scheller, S.; Shani, J.; Pietsz, G.; Czuba, Z. Synergistic Effect of Ethanolic Extract of Propolis and Antibiotics on the Growth of *Staphylococcus Aureus*. *Arzneimittel-Forschung* **1993**, *43*, 607–609.
- (246) Mirzoeva, O. K.; Grishanin, R. N.; Calder, P. C. Antimicrobial Action of Propolis and Some of Its Components: The Effects on Growth, Membrane Potential and Motility of Bacteria. *Microbiological Research* **1997**, *152*, 239–246.
- (247) AL-Waili, N. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *International Journal of Medical Sciences* **2012**, *9*, 793–800.
- (248) Wojtyczka, R. D.; Dziedzic, A.; Idzik, D.; Kępa, M.; Kubina, R.; Kabała-Dzik, A.; Smoleń-Dzirba, J.; Stojko, J.; Sajewicz, M.; Wąsik, T. J. Susceptibility of *Staphylococcus Aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Molecules* **2013**, *18*, 9623–9640.
- (249) Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2010**, *74*, 417–433.
- (250) Liu, B.; Pop, M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, D443–D447.
- (251) Theuretzbacher, U. Accelerating Resistance, Inadequate Antibacterial Drug Pipelines and International Responses. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2012**, *39*, 295–299.
- (252) Abdel-Lateff, A.; König, G. M.; Fisch, K. M.; Höller, U.; Jones, P. G.; Wright, A. D. New Antioxidant Hydroquinone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Acremonium Sp.* *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 1605–1611.
- (253) Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Prior, R. L. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 4437–4444.
- (254) Alomar, K.; Gaumet, V.; Allain, M.; Bouet, G.; Landreau, A. Synthesis, Crystal Structure, Characterisation, and Antifungal Activity of 3-Thiophene Aldehyde Semicarbazone (3STCH), 2,3-Thiophene Dicarboxaldehyde Bis(semicarbazone) (2,3BSTCH₂) and Their Nickel (II) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *115*, 36–43.
- (255) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard M27-A, Villanova, PA, 1997.
- (256) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard, NCCLS Document M38-A., Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, 2002.
- (257) Alomar, K.; Landreau, A.; Kempf, M.; Khan, M. A.; Allain, M.; Bouet, G. Synthesis, Crystal Structure, Characterization of zinc(II), cadmium(II) Complexes with 3-Thiophene Aldehyde

Thiosemicarbazone (3TTSCH). Biological Activities of 3TTSCH and Its Complexes. *Journal of inorganic biochemistry* **2010**, *104*, 397–404.

Chapitre V :

Propolis du monde

Chapitre V : Propolis du monde

Dans le cadre de cette thèse, nous avons également eu l'occasion d'étudier trois autres propolis provenant de régions du monde plus "exotiques" : l'Amérique Latine (Mexique), l'Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire) et l'Afrique de l'Est (Ouganda). Ces propolis seront comparées à la propolis BFA.

1. Echantillons de propolis

1.1. Propolis mexicaine (MEX)

L'échantillon de propolis mexicaine (224 g) a été collecté dans des ruches situées dans la péninsule du Yucatán et plus particulièrement dans la zone de Macario Gómez dans la ville de Solidaridad, dans l'état du Quintana Roo, au Mexique. Il fut obtenu fin 2012 dans un magasin de distribution de miel de la coopérative "Productores y Realizadores de Miel Maya" à Dzildzilche, situé entre Mérida et Cancún. Cet échantillon se présentait sous forme d'une grosse boule marron foncé dure et collante à la fois, avec une odeur neutre (Figure V-1a).

1.2. Propolis ivoirienne (CIV)

L'échantillon de propolis ivoirienne (40 g) a été collecté dans des ruches situées dans la zone de Katiola, proche de Bouaké au centre de la Côte d'Ivoire. Cet échantillon se présentait sous forme de morceaux orangés à bruns un peu agglomérés présentant une odeur semblable à celle de la propolis BFA (Figure V-1b).

1.3. Propolis ougandaise (OUG)

L'échantillon de propolis ougandaise (60 g) nous a été fourni lors d'un congrès Apimondia (Kiev, Ukraine, 2013) regroupant des participants du monde entier. Nous n'avons malheureusement pas pu, à ce jour, obtenir plus d'informations sur les sites et dates de collecte de cette propolis. Cette propolis se présentait sous forme d'agglomérat noir très dur, sans odeur particulière (Figure V-1c).

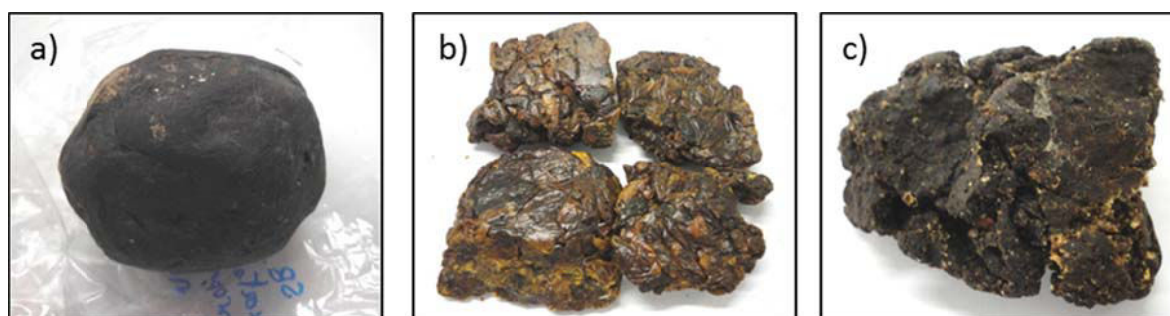


Figure V-1. Echantillons de propolis mexicaine (a), ivoirienne (b) et ougandaise (c)

2. Bibliographie disponible

2.1. Propolis mexicaine

L'analyse phytochimique d'une propolis rouge collectée à Campeche, dans le Sud-Est du Mexique, a montré la présence de flavanones, isoflavanes et ptérocarpanes, laissant supposer une possible relation entre cette propolis rouge du Mexique et les plantes du genre *Dalbergia*²⁷³. D'autres recherches ont montré une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram(-) de quelques échantillons de propolis collectés à Campeche²⁷⁴, une corrélation entre l'activité antimicrobienne d'une part et la composition de la propolis et des plantes collectées dans le centre du Mexique²⁷⁵ d'autre part et également l'identification par GC/MS de plus de 100 composés volatils provenant de deux échantillons de propolis collectés dans le Yucatán⁶². Enfin, une étude sur la composition chimique et les activités biologiques de trois propolis collectées dans des régions arides et semi-arides de l'état du Sonora, a montré la présence de dérivés d'acides cinnamiques et phénylpropanoïques ainsi que des flavonoïdes comme composés majoritaires associés aux activités antibactériennes, antioxydantes et cytotoxiques^{31,45}.

2.2. Propolis ivoirienne

Il n'existe pas de bibliographie sur la propolis de Côte d'Ivoire, mais de très récentes études (2014) ont été publiées sur des propolis provenant de quelques pays d'Afrique de l'Ouest. De nouveaux stilbènes prénylés et géranylés ont été isolés d'une propolis provenant du Ghana et également une ploroglucine prénylée d'une propolis du Cameroun, cette dernière présentant une très bonne activité contre le parasite *Trypanosoma brucei brucei* impliqué dans la maladie du sommeil²⁷⁶. Une étude sur une autre propolis camerounaise a montré la présence de triterpènes et de lipides phénoliques [alk(en)ylrésorcinoles]²⁷⁷. Enfin, l'analyse de la composition chimique d'une propolis provenant du Nigéria a révélé la présence de flavonoïdes prénylés et géranylés ainsi que de stilbènes géranylés (schweinfurthines B et C, mappaine) associés aux espèces de *Macaranga*²⁷⁸.

2.3. Propolis ougandaise

Il y a très peu de bibliographie sur la propolis provenant d'Ouganda. Seuls Zhang *et al.* ont décrit très récemment, dans une étude comparative de plusieurs propolis provenant d'Afrique (dont la propolis nigériane précédemment décrite), que les composés majoritaires de la propolis ougandaise étudiée étaient des triterpènes, et principalement des dérivés d'amyriines et de lupéol²⁷⁸. Il existe cependant plusieurs articles sur la propolis d'Afrique de l'Est, provenant par exemple du Kenya, ou encore d'Ethiopie. Une étude sur une propolis kenyane a révélé que ses constituants majoritaires étaient des géranylflavonoïdes (par exemple, la macarangine), des géranylstilbènes (les schweinfurthines A et B) et des lignanes provenant probablement d'espèces de *Macaranga*^{5,69}. Une

étude sur une propolis d'Éthiopie a montré que celle-ci contenait majoritairement de la pinocembrine avec un peu de galangine, de naringénine et d'apigénine³⁶. L'analyse de la composition chimique par GC/MS d'une autre propolis éthiopienne, collectée à l'université d'Haramaya dans l'Est du pays, révèle la présence de constituants aminés tels que la N,N-dibutylbenzèneamine, la paromomycine (antibiotique aminoside), la N-méthyl-N-[4-(1-pyrrolidinyl)-2-butinyl]-4-aminobutyramide, entre autres, associés à des activités antifongiques contre *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger* et *Colletotrichum sp.*²⁷⁹.

3. Compositions chimiques

3.1. Extractions

3.1.1. Extractions éthanoliques

Ces trois propolis ont été extraites par de l'éthanol à 95% en utilisant le même protocole que pour la propolis BFA. La figure V-2 donne les rendements d'extraction de ces trois propolis ainsi que celui de l'extrait E03 de la propolis BFA (rebaptisé dans ce chapitre FRA*).

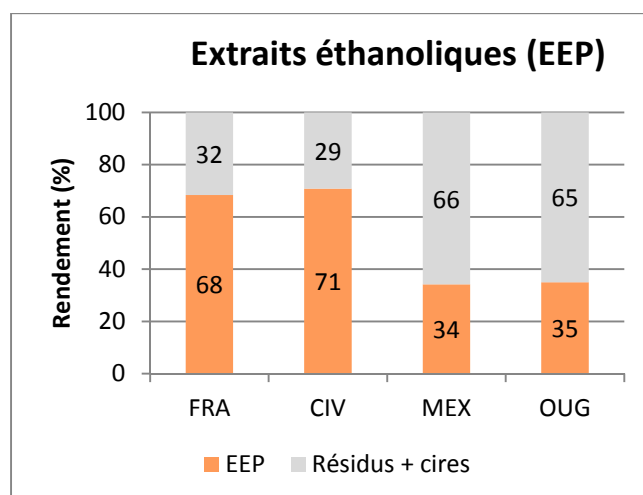


Figure V-2. Comparaison des rendements d'extraction éthanolique (EEP) des 4 propolis [origines : France (FRA), Côte d'Ivoire (CIV), Mexique (MEX) et Ouganda (OUG)]

Les 4 propolis se répartissent en deux groupes distincts :

- le premier avec des rendements en EEP de l'ordre de 68-71% soit environ 2/3 par rapport à la propolis brute, pour les propolis française et ivoirienne
- le deuxième avec des rendements de 34-35% en EEP soit environ 1/3 par rapport à la propolis brute, pour les propolis mexicaine et ougandaise

* Les figures et les tableaux de ce chapitre faisaient l'objet d'une communication orale destinée à être présentée aux Journées Nationales de l'Apiculture de Côte d'Ivoire en mai 2014 (finalement annulées). La propolis BFA est alors rebaptisée FRA pour "France".

3.1.2. Extractions successives

Ces propolis ont également subi des extractions successives par des solvants de polarité croissante : cyclohexane, DCM et MeOH. La figure V-3 compare les valeurs des rendements des extraits de la propolis BFA (E04-cylohexane, E04-DCM et E04-AcOEt+MeOH) avec ceux des trois propolis exotiques.

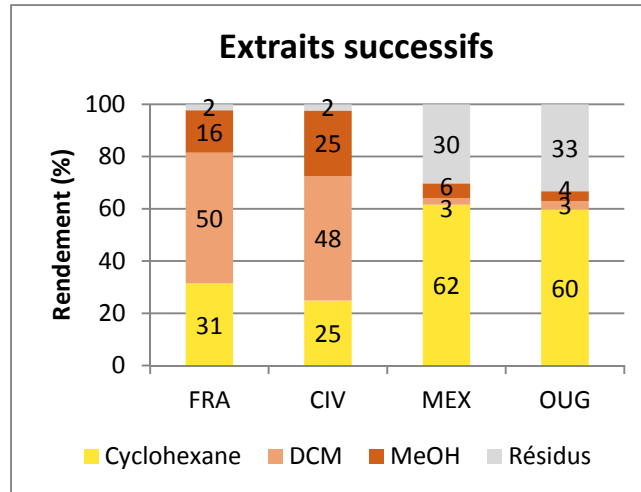


Figure V-3. Comparaison des rendements d'extractions successives des 4 propolis

Cette fois encore, on note des similitudes entre les propolis française et ivoirienne d'une part et entre les propolis mexicaine et ougandaise d'autre part. Le premier groupe possède des rendements en extraits cyclohexaniques de 25 à 31% alors que le deuxième groupe possède des rendements deux fois supérieurs. Les propolis mexicaine et ougandaise semblent donc contenir plus de cires ou de composés apolaires que les deux autres propolis. De plus, les rendements en extraits DCM (de l'ordre de 50%) et en extraits MeOH (de l'ordre de 20%) des propolis française et ivoirienne indiquent qu'elles contiennent davantage de composés moyennement polaires à polaires. Enfin, le taux de résidus insolubles représente quasiment le tiers du rendement total des propolis mexicaine et ougandaise.

3.2. Dosages des polyphénols totaux

Les taux de polyphénols totaux des EEP des quatre propolis sont rassemblés sur la figure V-4.

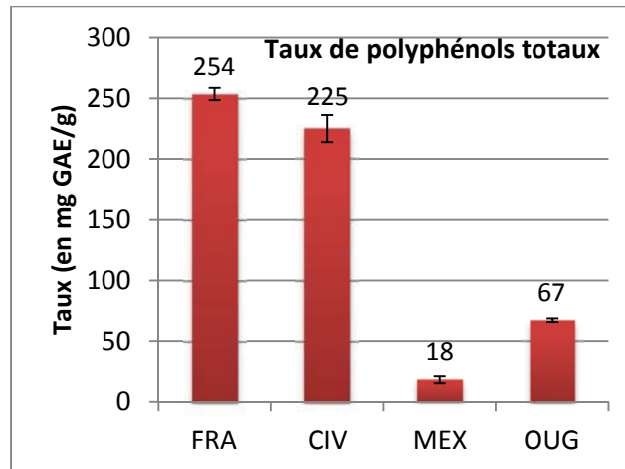


Figure V-4. Comparaison des taux de polyphénols totaux des 4 propolis (EEP)

Les propolis française et ivoirienne possèdent des taux de polyphénols totaux compris entre 200 et 300 mg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par gramme d'extrait, caractéristiques des propolis de type peuplier. En revanche, ceux des propolis mexicaine et ougandaise sont plus faibles, et particulièrement celui de la propolis mexicaine avec seulement 18 mg GAE/g.

3.3. Profils chromatographiques

3.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse des EEP des 4 propolis par CCM (Figure V-5) nous confirme la distinction des deux groupes précédemment définis : les propolis française et ivoirienne d'une part contenant des composés avec des rapports frontaux (R_f) inférieurs à 0.33 et les propolis mexicaine et ougandaise d'autre part avec des composés majoritaires moins polaires (R_f : 0.57, 0.93 et 0.96).

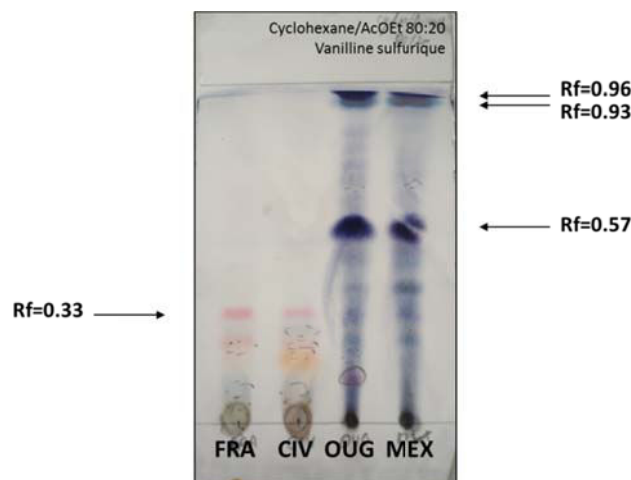


Figure V-5. Comparaison des profils CCM des 4 propolis (EEP)

3.3.2. HPLC/DAD

Les profils HPLC/DAD des trois propolis exotiques et française (EEP) sont rassemblés sur la figure V-6.

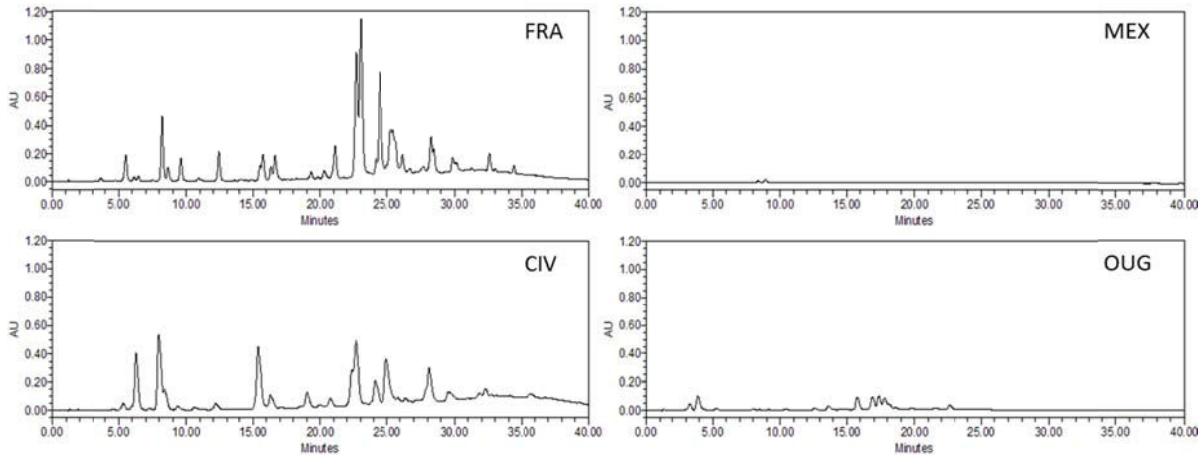


Figure V-6. Comparaison des profils HPLC/DAD, présentés à la même échelle, des 4 propolis (EEP, 10 mg/mL, méthode 1, λ 280 nm)

La propolis ivoirienne possède un profil HPLC qui peut se rapprocher de celui de la française. En revanche, la propolis mexicaine ne contient pas de polyphénols ou de manière générale de composés absorbant dans l'UV-visible (vérifié sur une plage de 200 à 600 nm). Quant à la propolis ougandaise, elle contient quelques composés absorbant en UV-visible mais en très faibles quantités.

3.4. Identification des constituants majoritaires

3.4.1. Propolis mexicaine

a) Fractionnement par Chromatographie Flash

La fractionnement par chromatographie Flash de l'EEP mexicaine nous a permis d'obtenir trois fractions principales (Figure V-7) contenant les composés majoritaires, comptant pour plus de 70% de l'extrait total (Tableau V-1).

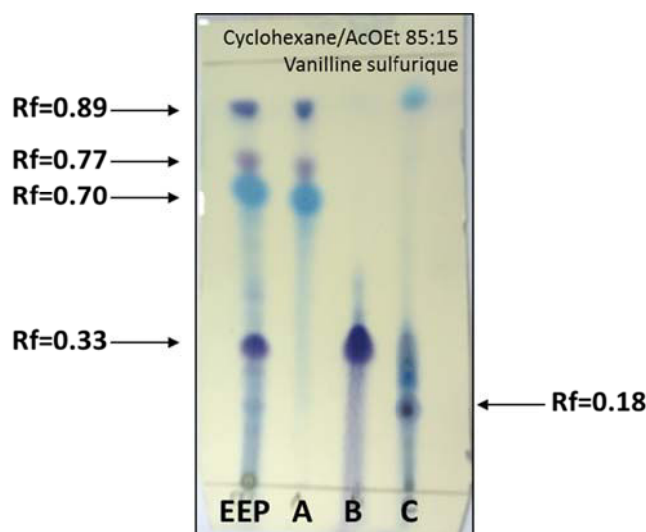


Figure V-7. CCM de l'EEP mexicaine et des fractions A, B et C

Tableau V-1. Rendements des fractions A, B and C et valeurs de Rf des composés majoritaires (CCM)

Fractions	Rendement (%)	Rf*
A	47.7	0.89, 0.77, 0.70
B	19.9	0.33
C	4.1	0.18
Total	71.7	

*Cyclohexane/AcOEt 85:15, vanilline sulfurique

La fraction A contient un mélange de trois composés très apolaires (Rf de 0.89, 0.77 et 0.70) et pèse pour près de la moitié de l'extrait total. La fraction B semble, quant à elle, ne contenir qu'un constituant (Rf = 0.33) pour près d'un cinquième de l'extrait total. La fraction C ne représente que 4% de l'extrait total.

b) Analyses RMN

Les analyses RMN ^1H de l'EEP et des fractions A, B et C indiquent la présence de signaux majoritaires dans la zone 0.7-3.0 ppm accompagnés de quelques pics entre 4.5 et 5.5 ppm, alors que la majorité des signaux dans les spectres ^{13}C correspondants sortent entre 15 et 60 ppm, accompagnés de quelques pics vers 110-150 ppm. Ces profils RMN correspondent donc à ceux des terpénoïdes (Annexe 8 page 362). Des analyses de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) ont donc été entreprises afin d'identifier les composés majoritaires de cette propolis mexicaine.

c) Analyses GC/MS

L'analyse de la fraction A révèle la présence d'un mélange d' α et β -amyrénones (**MEX-1** et **2**), contenant une petite quantité d'acétate d' α -amyrine (**MEX-3**). Celle de la fraction B indique un mélange d' α -amyrine (**MEX-4**, majoritaire) et de β -amyrine (**MEX-5**, minoritaire). L'analyse de la fraction C permet l'identification d'un mélange de stérols : le fucostérol (**MEX-6**) étant majoritaire et un mélange de β/γ -sitostérols (**MEX-7** et **8**) comme composés minoritaires. Les chromatogrammes GC et spectres de masse des fractions A, B et C sont consultables en annexe 9 (page 365). Les composés **MEX-1** à **8** sont regroupés sur le chromatogramme GC de l'EEP mexicaine (Figure V-8) et leurs structures sur la figure V-9.

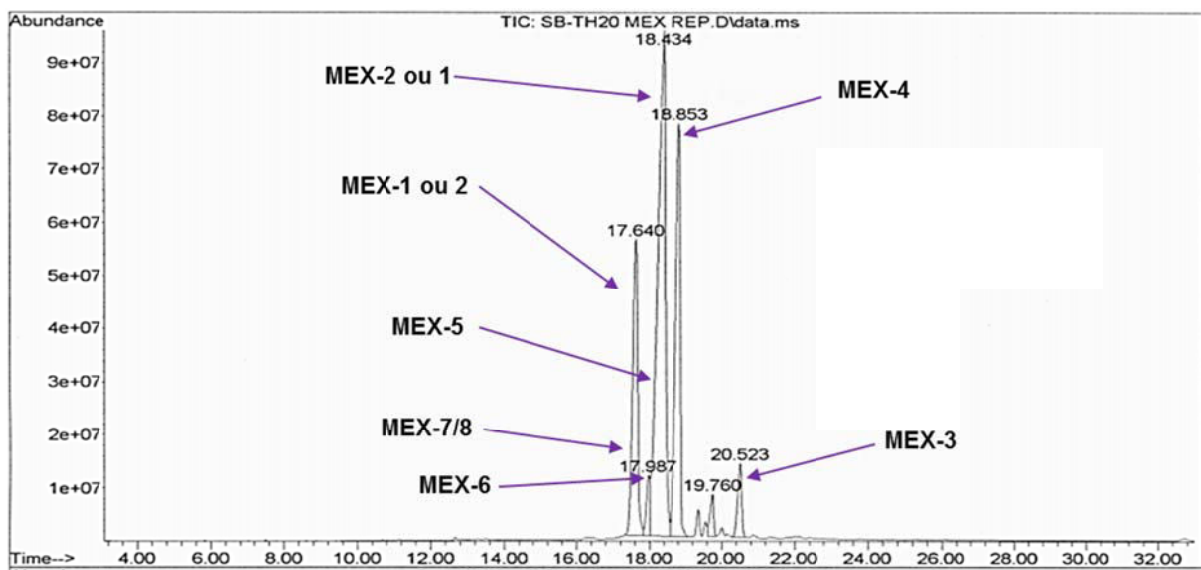


Figure V-8. Chromatogramme GC (Courant ionique total TIC) de l'EEP mexicaine

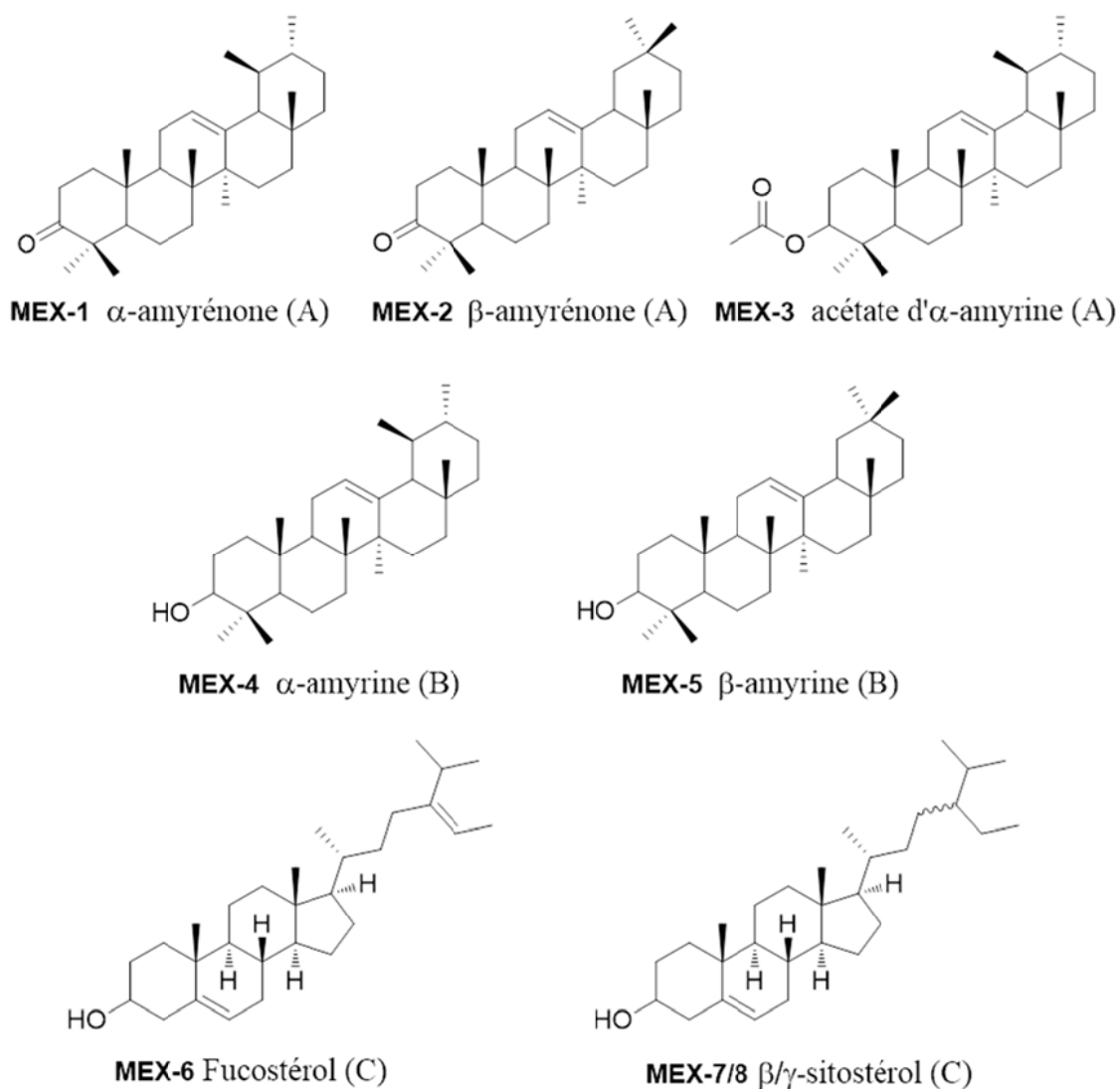


Figure V-9. Structures des composés MEX-1 à 8 (issus des fractions A, B ou C)

Les constituants de la propolis mexicaine sont donc majoritairement des dérivés triterpéniques : dérivés des α et β -amyrines et stérols.

d) Composition chimique inhabituelle

Les résultats obtenus lors de ces recherches étaient inattendus puisqu'il existe un nombre très limité d'articles rapportant les triterpénoïdes comme composés majoritaires de la propolis^{81,280,281} et aucun des types de propolis décrits dans la première partie de ce manuscrit ne mentionne les triterpènes comme composés majoritaires^{5,142}. De plus, ces résultats ne sont pas en accord avec certains articles indiquant que les triterpénoïdes sont rarement mentionnés en tant que constituants de propolis parce que la plupart des analyses de composition chimique sont réalisées à l'aide d'extraits alcooliques²⁸², ou que les triterpénoïdes sont seulement collectés de façon occasionnelle à côté d'autres classes de métabolites secondaires tels que les polyphénols²⁸³.

e) Source botanique probable

Les deux plantes probablement visitées par les abeilles pour leur production de propolis dans la région du Quintana Roo où l'échantillon a été collecté sont communément connues sous leur nom Maya "chakah" [*Bursera simaruba* (L.) Sarg.] (Figure V-10) et "tsalam" [*Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth.][†] (Figure V-11), faisant partie de forêts matures semi-décidues[‡] de stature moyenne²⁸⁴.



Figure V-10. *Bursera simaruba* (Jardin botanique du CICY, Mérida, Mexique)

(Source : Anne-Marie Le Ray)



Figure V-11. *Lysiloma latisiliquum* (Jardin botanique du CICY, Mérida, Mexique)

(Source : Anne-Marie Le Ray)

Alors qu'aucune information n'est disponible pour *L. latisiliquum*, les feuilles et la résine de *B. simaruba* a été étudiée et contient des lignanes biologiquement actifs²⁸⁵ et des triterpènes pentacycliques, dont les α -amyrine (**MEX-4**) et β -amyrine (**MEX-5**)²⁸⁶. Ainsi, ces résultats confirment bien le lien qu'il existe entre la flore disponible pour les abeilles dans une région donnée et la composition chimique de la propolis qu'elles fabriquent^{5,81,93,122,142,287}, et le fait que dans les régions

[†] D'après une communication personnelle avec Luis Ignacio Hernández-Chávez, *Instituto Superior de Felipe Carrillo Puerto, Carrillo Puerto, Quintana Roo, Mexique*

[‡] Forêt semi-décidue : Forêt dans laquelle une partie seulement des arbres est à feuilles caduques, c'est-à-dire qui tombent et repoussent au rythme des saisons.

tropicales, la composition chimique de la propolis peut être extrêmement variable à cause de la richesse et de la diversité de la flore locale¹²⁰.

3.4.2. Propolis ivoirienne

La propolis ivoirienne présente des similitudes avec la propolis française BFA, comme l'ont montré les rendements d'extraction, les profils CCM et HPLC/DAD. L'analyse HPLC/MS a confirmé la présence d'ions quasi moléculaires correspondant aux composés retrouvés dans la propolis française et l'analyse HPLC/DAD (méthode 2) a permis de quantifier les 12 marqueurs précédemment choisis pour la propolis BFA et caractéristiques des propolis de type peuplier.

a) Analyse HPLC/DAD (méthode 2)

Les chromatogrammes HPLC/DAD des EEP des propolis française et ivoirienne sont rassemblés sur la figure V-12.

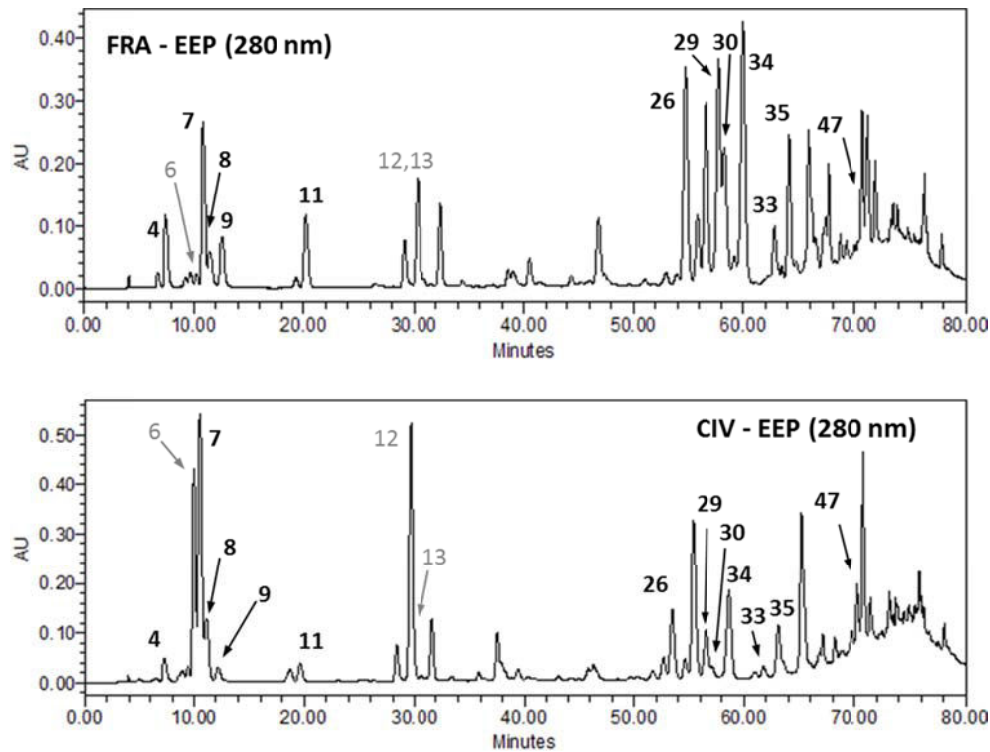


Figure V-12. Chromatogrammes HPLC/DAD des propolis française et ivoirienne (EEP, 5 mg/mL, méthode 2, λ 280 nm)

La quantification des 12 marqueurs selon la même méthode que celle utilisée pour la propolis BFA donnent les résultats suivants (Tableau V-2) :

Tableau V-2. Quantification des 12 marqueurs pour les EEP des propolis française et ivoirienne

Marqueurs	FRA (EEP)	CIV (EEP)
	Teneur (en mg/g d'extrait)	
Ac caféique (4)	6.9 ± 0.1	3.3 ± 0.2
Ac <i>p</i> -coumarique (7)	10.7 ± 0.1	24.3 ± 1.1
Ac férulique (8)	4.1 ± 0.1	9.0 ± 0.3
Ac isoférulique (9)	4.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2
Ac 3,4-diméthoxy. (11)	7.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2
Pinocembrine (26)	35.2 ± 0.2	14.8 ± 0.8
Pinobanksine-3-ac (29)	40.2 ± 0.3	12.6 ± 0.7
Caféate prényle (30)	20.2 ± 0.5	2.0 ± 0.1
Chryisine(34)	24.7 ± 0.1	11.4 ± 0.5
CAPE (33)	11.2 ± 0.2	3.6 ± 0.4
Galangine (35)	21.9 ± 0.2	12.7 ± 1.3
Pinostrobin (47)	10.7 ± 0.1	7.9 ± 0.0
Total	195.3 ± 1.1	105.9 ± 2.6

L'EEP ivoirienne est moins riche en 10 de ces 12 marqueurs que l'EEP BFA (presque moitié moins) et plus riche pour 2 des marqueurs : acide *p*-coumarique (7) et férulique (8) dont les quantités sont doublées. Il semble également, au regard du chromatogramme HPLC, que cette propolis de Côte d'Ivoire contient davantage de 4-hydroxyacétophénone (6) et d'acide cinnamique (12) mélangé avec un peu d'acide 4-méthoxycinnamique (13).

b) Source botanique probable

L'analyse HPLC/DAD (confirmée par les données MS) révèle donc la présence des mêmes composés phénoliques que ceux rencontrés dans la propolis française, arrivant donc à la conclusion que la propolis de Côte d'Ivoire serait de type peuplier. Mais à notre connaissance, le peuplier n'est pas distribué sur le sol ivoirien. Les différents types de végétation rencontrés sur le territoire ivoirien sont présentés sur la figure V-13.

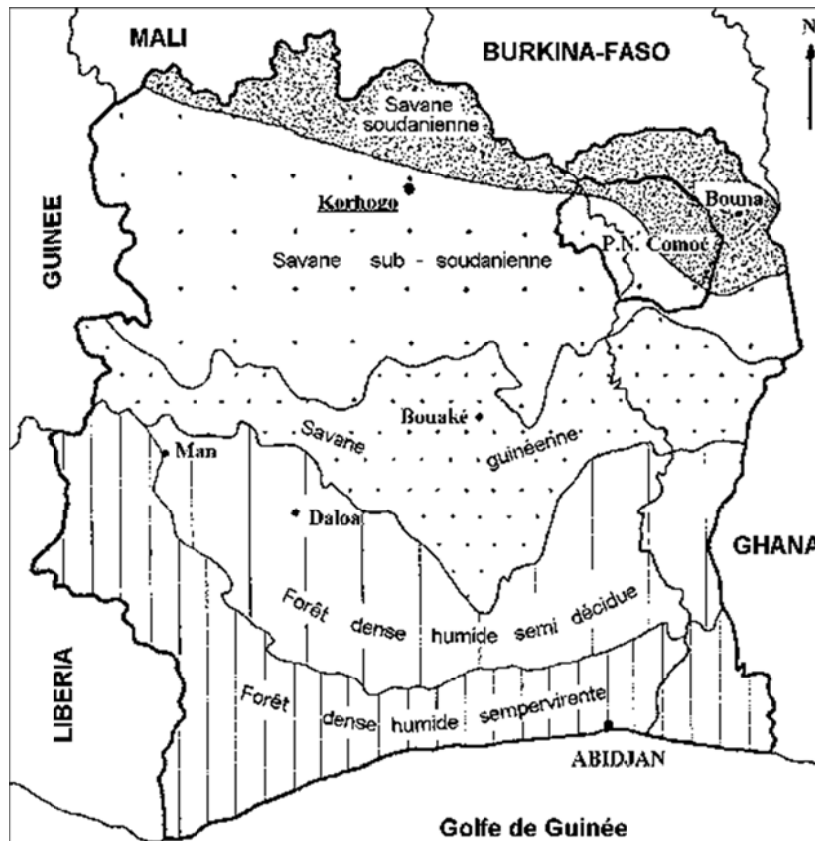


Figure V-13. Carte de la végétation de Côte d'Ivoire

(Source <http://www.fao.org/docrep/003/X6885F/x6885f0b.htm>)

La zone de Bouaké se trouve au centre de la Côte d'Ivoire dans la savane guinéenne. Voici la liste des espèces de 31 plantes présentes dans la savane guinéenne et donc susceptibles d'être les sources possibles de la propolis (les plus fréquentes sont en gras)²⁸⁸ : **Acacia polyacantha**, *Azelia africana*, *Albizzia zygia*, *Andira inermis*, *Anogeisus leiocarpus*, *Anthiaris africana*, *Anthocleista nobilis*, **Blighia ferruginea**, *Cassia sieberiana*, *Carapa procera*, *Ceiba pentandra*, *Detarium microcarpum*, *Diospiros mespiliformis*, **Entada abyssinica**, *Faidherbia albida*, *Ficus gnaphalocarpa*, *Ficus easperata*, **Isobertinia doka**, *Khaya senegalensis*, *Lophira lanceolata*, *Milicia excerta*, *Milicia regia*, **Pentatesma butyracea**, **Pterocarpus erinaceus**, **Sarcocephalus latifolius**, *Securidaca longepedunculata*, *Spondias mombin*, *Sterculia setigera*, *Tamarindus indica*, **Trichilia emetica**, *Vitellaria pardoza*. La flore de la savane guinéenne est particulière, elle est constituée d'un ensemble d'espèces dont aucune n'est propre à cette région en particulier. Parmi ces espèces, les unes provenant du Sud, appartiennent à la flore des forêts denses, tandis que d'autres provenant du Nord, appartiennent à celle des forêts claires. D'autres encore, beaucoup moins nombreuses, héliophytes ou hydrophytes, donc écologiquement spécialisées, appartiennent à un ensemble floristique représenté dans une très large zone climatique, depuis les bordures sahariennes jusqu'au littoral²⁸⁹.

Parmi ces 31 espèces, nous avons essayé de chercher si certaines d'entre elles étaient chimiotaxonomiquement proches du peuplier. Les compositions en métabolites secondaires de cinq espèces ont été décrites dans la littérature :

- *Detarium microcarpum* : alcaloïdes, flavonoïdes, stéroïdes et terpénoïdes²⁹⁰
- *Khaya senegalensis* : flavonoïdes, saponines et tanins notamment^{291,292}
- *Spondias mombin* : tanins, anthraquinones, flavonoïdes et saponines²⁹³
- *Tamarindus indica* : tanins, flavonoïdes et stéroïdes²⁹⁴
- *Trichilia emetica* : flavonoïdes²⁹⁵.

Ces cinq espèces contiennent toutes des flavonoïdes et pourraient par conséquent être une source végétale probable de la propolis ivoirienne étudiée. Cependant, seules les classes de métabolites secondaires ont été évaluées, nous n'avons donc pas davantage d'information sur l'identité structurale de ces flavonoïdes. Il nous est donc impossible d'associer pour l'instant la composition chimique de cette propolis ivoirienne à une ou plusieurs espèces présentes sur ce territoire. Des études complémentaires vont être entreprises et seront évoquées en conclusion de ce chapitre.

3.4.3. Propolis ougandaise

La CCM comparative des 4 propolis (Figure V-5 section 3.3.1 page 251) nous informe clairement que les composés majoritaires de la propolis ougandaise appartiennent à la même famille que ceux de la propolis mexicaine *i.e.* des dérivés triterpéniques. Cependant, la propolis ougandaise contient en plus quelques composés absorbant dans l'UV en quantité modérée (chromatogrammes HPLC figure V-6 section 3.3.2 page 252) auxquels nous nous sommes également intéressés.

Une CCM regroupant d'une part les EEP des propolis mexicaine et ougandaise (1 et 2, pour comparaison) et d'autre part, les extraits successifs par le cyclohexane (3), le DCM (4) puis le MeOH (5) de la propolis ougandaise, est présentée sur la figure V-14.

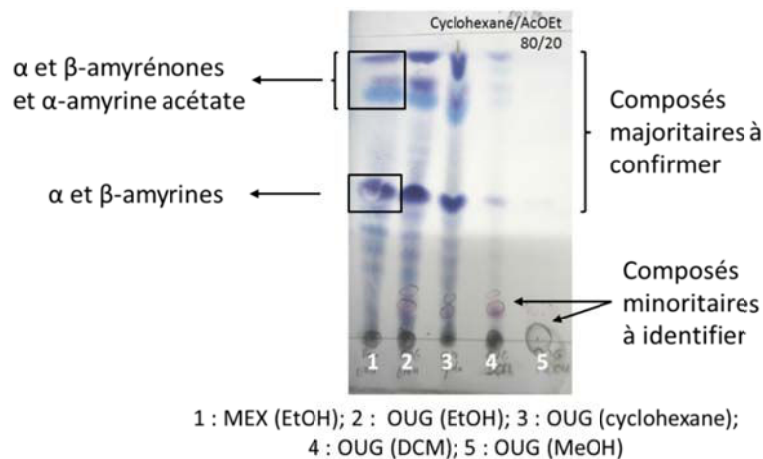


Figure V-14. CCM des EEP MEX et OUG et des extraits successifs de OUG

L'extrait cyclohexanique contient principalement les cires et les composés majoritaires dont l'identité reste à confirmer. L'extrait OUG-DCM contient encore une petite quantité de composés triterpéniques, mais également les composés minoritaires que l'on cherche à identifier. Dans un premier temps, l'analyse GC/MS de l'extrait OUG-DCM va nous permettre de confirmer les structures des composés triterpéniques majoritaires, et dans un second temps, l'analyse déréplicative suivie du fractionnement de ce même extrait nous permettra d'identifier deux composés minoritaires. Le fractionnement de l'extrait OUG-MeOH conduira à l'identification de trois molécules, parmi les plus polaires.

a) Extrait OUG-DCM

- Analyse GC/MS

L'analyse GC/MS de l'extrait OUG-DCM (*cf.* annexe 10 page 368) indique la présence des α et β -amyrines (**OUG-4** et **2**), β -amyronone (**OUG-1**), de la lupénone (**OUG-3**), de l'acétate de β -amyrine (**OUG-5**) et d'un ester méthylé de l' α -amyrine (**OUG-6**) en tant que composés majoritaires (Figures V-15 et 16).

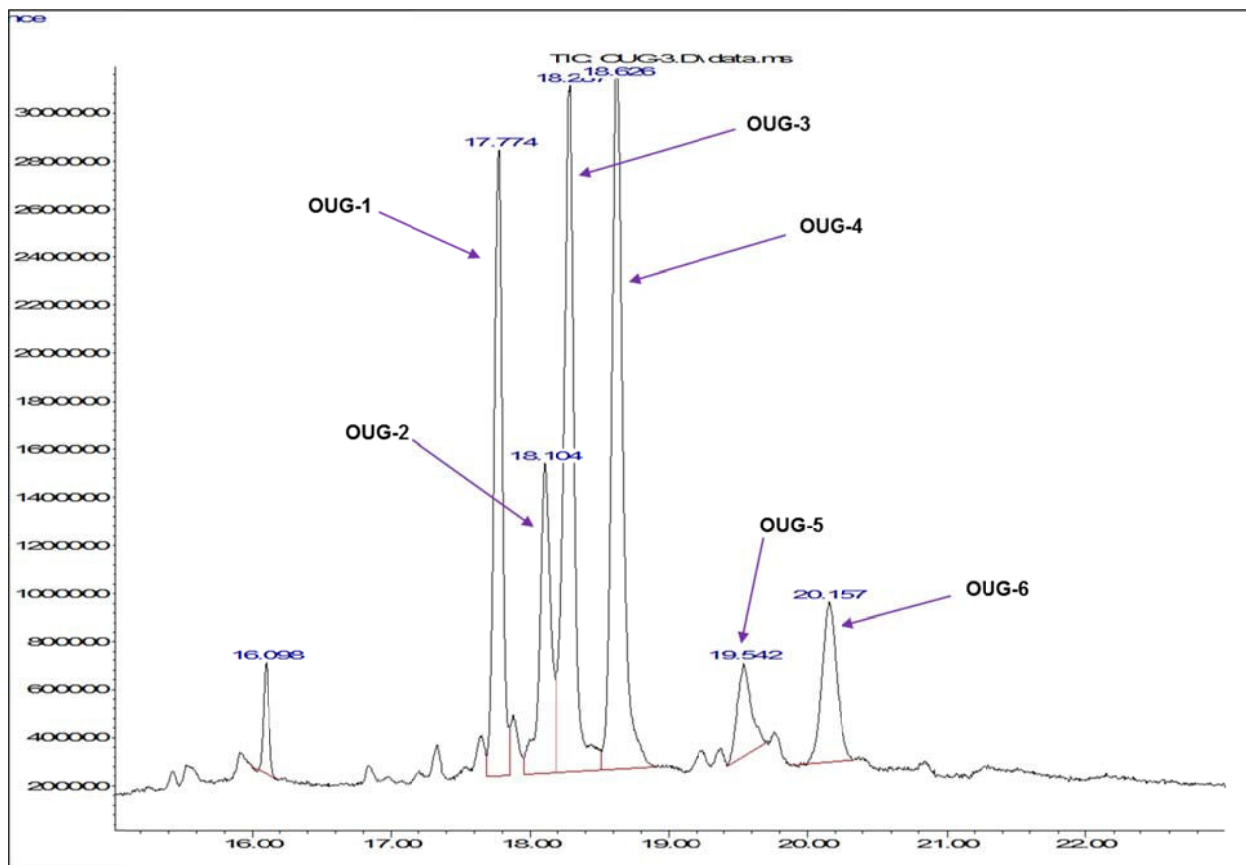


Figure V-15. Chromatogramme GC (TIC) de l'extrait OUG-DCM (zoom 15-23 min)

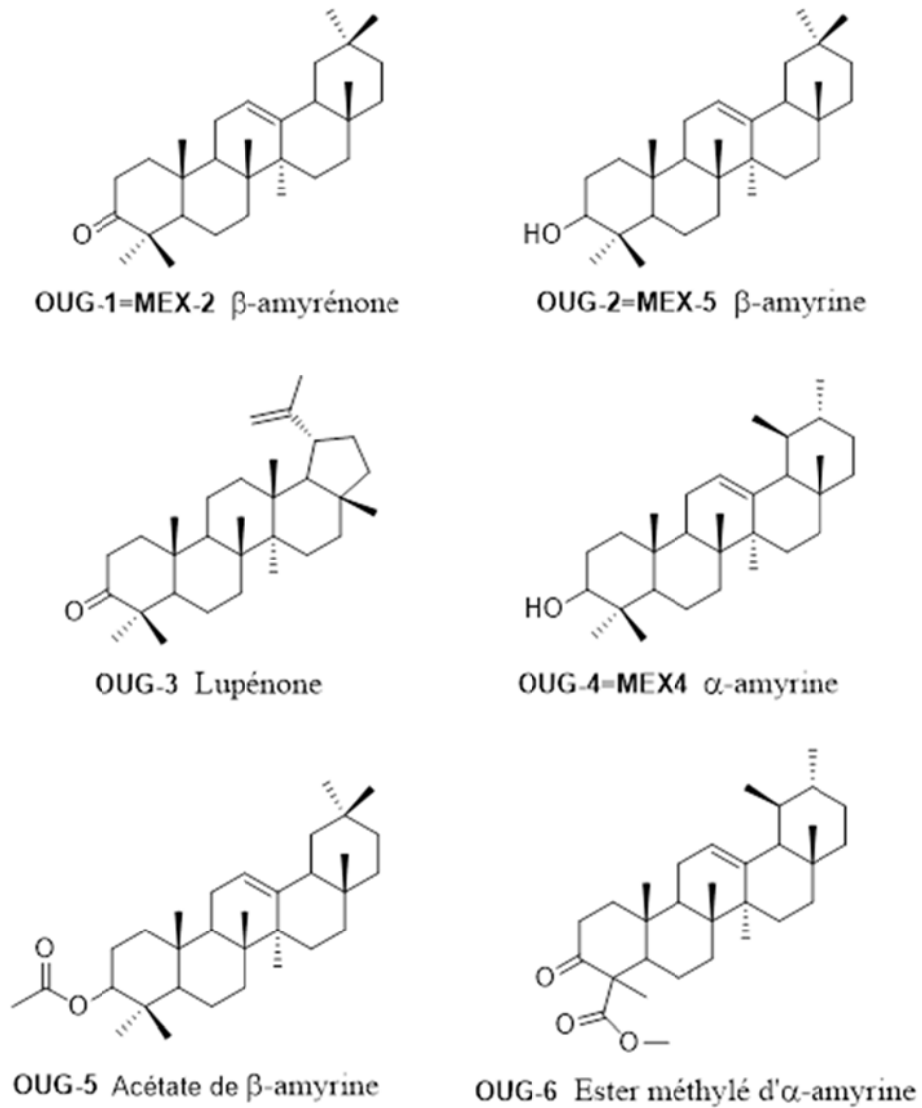


Figure V-16. Structures des composés OUG-1 à 6

Trois triterpènes, les α et β -amyrines ainsi que la β -amyronone, sont communs aux propolis mexicaine et ougandaise, les trois autres étant des dérivés similaires.

- Analyse déréplicative

Une analyse HPLC/DAD/MS a tout d'abord été réalisée sur l'extrait OUG-DCM afin d'identifier les composés minoritaires contenus dans celui-ci. Le chromatogramme HPLC ainsi que les profils UV et données MS des principaux composés sont présentés sur la figure V-17.

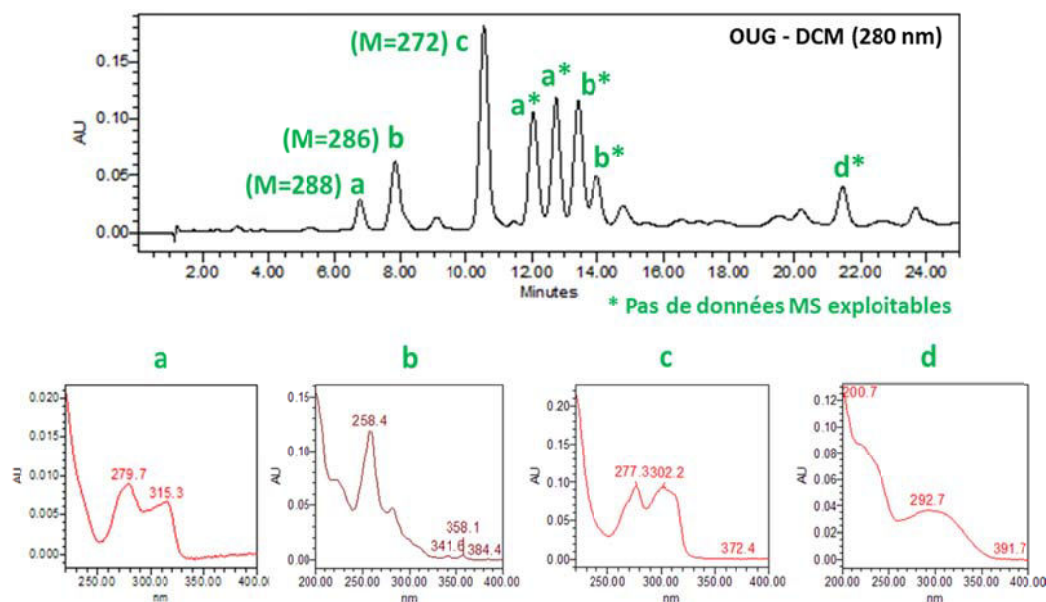


Figure V-17. Chromatogramme HPLC de l'extrait OUG-DCM (méthode 3, λ 280 nm) et profils UV de ses composés majoritaires

Parmi les huit composés principaux, trois ont le profil "a", trois autres ont le profil "b", un seul possède le profil "c" et un seul également a le profil "d". Les trois profils UV a, b et c ne correspondent pas aux molécules ou familles de molécules déjà rencontrées dans les propolis française et ivoirienne, la propolis ougandaise semble donc contenir des familles de composés différentes. D'après la revue de Salatino *et al.* de 2011 regroupant les différents types de propolis, leur composition chimique et leur probable source botanique⁵, la propolis provenant du Kenya, pays limitrophe de l'Ouganda, contenait des lignanes, des géranylstilbènes et des géranylflavonoïdes pouvant être issus du genre *Macaranga*. Or les profils UV des constituants de notre propolis ougandaise ne correspondaient pas aux données UV décrites dans la littérature^{69,296,297} pour ce type de composés. La déréplication ne permettant pas ici l'identification des molécules, il s'est donc avéré nécessaire de fractionner et de purifier.

- Purification par Chromatographie Flash

Une étude préliminaire a consisté à étudier deux fractions parmi les 15 récupérées (fractions A-O) lors de la chromatographie Flash de l'extrait OUG-DCM. Il s'agit de celles contenant les deux composés ciblés sur la CCM (Figure V-14 section 3.4.3 page 260) : le premier composé (**OUG-7**) dans la fraction F, absorbant dans l'UV (et violet après révélation à la vanilline sulfurique) et le deuxième (**OUG-8**) dans la fraction G, rose après révélation à la vanilline sulfurique (Figure V-18).

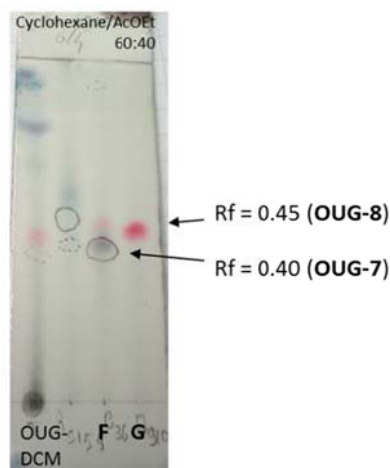


Figure V-18. CCM comprenant les 2 fractions F et G (**OUG-7** et **8**)

- Elucidation structurale de **OUG-7** et **OUG-8** (fractions CF14-F et G)

Les données HPLC/UV de la fraction CF14-F sont regroupées sur la figure V-19.

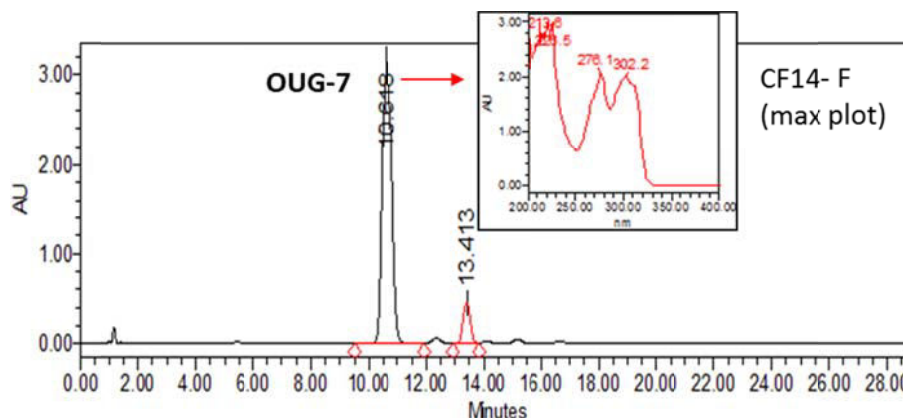


Figure V-19. Chromatogramme HPLC de la fraction CF14-F (méthode 3, max plot) et profil UV du composé **OUG-7**

Les données ESI-MS du composé **OUG-7** indiquent un ion $[M-H]^-$ à m/z 271, soit une masse molaire de 272 g/mol. Le spectre RMN 1H (dans le chloroforme deutéré) présente des protons aromatiques (4H) entre δ 6.2 et 8.0 ppm, deux méthoxyles à δ 3.87 et 3.91 ppm et deux multiplets à δ 2.67 et 2.68 ppm, caractéristiques des deux CH_2 d'un 9,10-dihydrophénanthrène (Figure V-20).

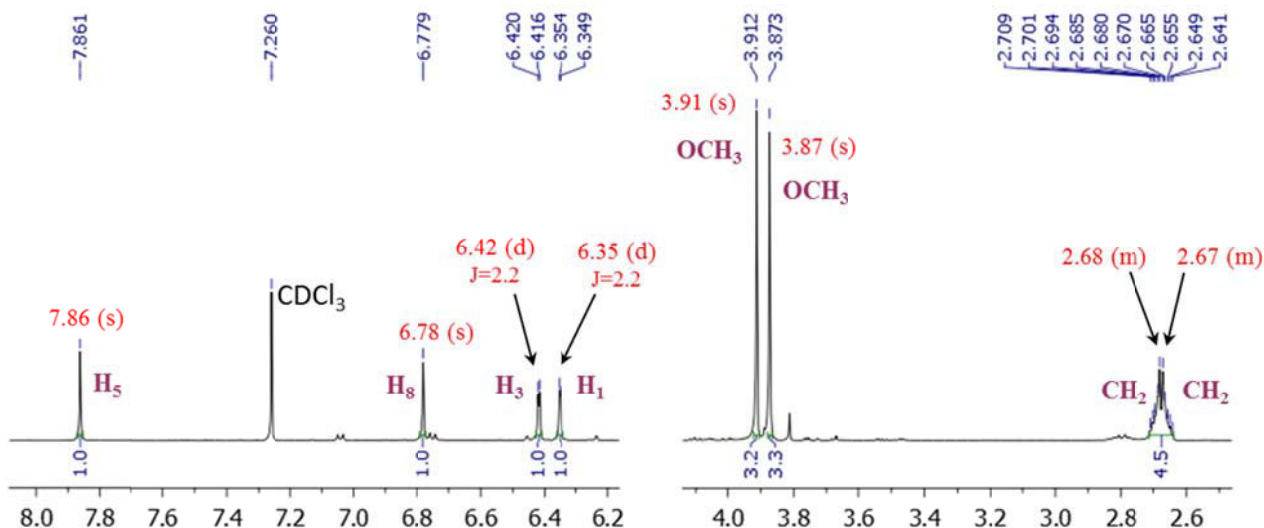
OUG-7 (CDCl₃, 500 MHz)

Figure V-20. Spectre RMN ¹H (zones δ 2.5-4.0 ppm et δ 6.2-8.0 ppm) du composé OUG-7 (500 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} 0 ppm)

Le spectre RMN ¹³C nous révèle la présence de 16 carbones. Après analyse des spectres RMN 2D COSY, HMQC, HMBC et NOESY (spectres en annexe 11 page 372), la structure proposée pour **OUG-7** est le 2,7-dihydroxy-4,6-diméthoxy-9,10-dihydrophénanthrène soit la 6-méthoxycoelonine²⁹⁸ (Figure V-21) de formule C₁₆H₁₆O₄.

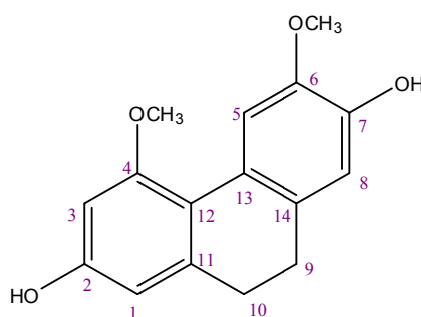


Figure V-21. Structure de la 6-méthoxycoelonine (OUG-7)

Les valeurs des données RMN ¹H et ¹³C (dans CDCl₃) et les corrélations 2D de **OUG-7** sont regroupées respectivement dans le tableau V-3 et sur la figure V-22.

Tableau V-3. Données RMN ^1H et ^{13}C (dans CDCl_3) du composé OUG-7

Position	OUG-7	
	δ_{H} , mult (J en Hz)	δ_{C} , mult
1	6.35, d (2.2)	107.6, CH
2		154.7, qC
3	6.42, d (2.2)	98.3, CH
4		157.7, qC
5	7.86, s	111.4, CH
6		144.5, qC
7		143.7, qC
8	6.78, s	113.6, CH
9	2.68, m ^a	29.1, CH ₂
10	2.67, m ^a	30.9, CH ₂
11		141.4, qC
12		116.8, qC
13		124.8, qC
14		131.5, qC
OCH ₃ -4	3.87, s ^b	56.3, CH ₃
OCH ₃ -6	3.91, s ^b	55.8, CH ₃

a,b interchangeables

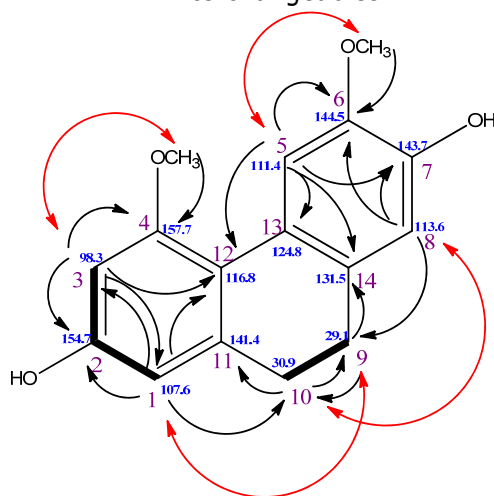


Figure V-22. Corrélations COSY (liaisons en gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé OUG-7

Leong *et al.*²⁹⁸ ont identifié la 6-méthoxycoelonine en 1997 dans un extrait cyclohexanique d'une espèce d'orchidée *Bulbophyllum vaginatum* collectée à Singapour. Ce composé a également été identifié dans des espèces de Combretaceae (*Combretum hereroense*, *C. collinum* et *C. apiculatum*), dans le sud du continent africain²⁹⁹. Cette molécule n'avait jamais précédemment été décrite comme constituant d'une propolis.

En ce qui concerne le composé **OUG-8**, les données HPLC/UV de la fraction CF14-G sont regroupées sur la figure V-23.

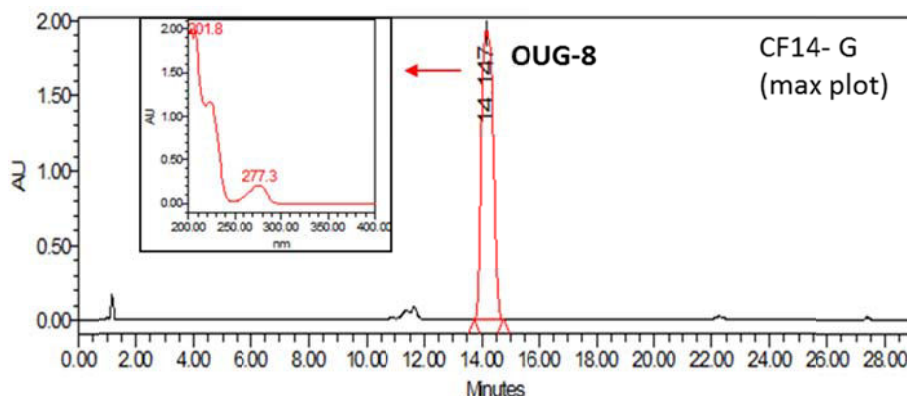


Figure V-23. Chromatogramme HPLC de la fraction CF14-G (méthode 3, max plot) et profil UV du composé OUG-8

Les données ESI-MS de **OUG-8** n'étaient pas exploitables. C'est la technique d'ionisation chimique (CI) qui nous a permis d'obtenir la masse molaire de **OUG-8**, avec un ion $[M+H]^+$ à m/z 245, soit une masse molaire de 244 g/mol. Le spectre RMN 1H (dans $CDCl_3$) présente des protons aromatiques (7H) entre δ 6.2 et 7.1 ppm, un méthoxyle à δ 3.75 ppm et deux multiplets à δ 2.80 et 2.81 ppm, similaires aux deux CH_2 d'un 9,10-dihydrophénanthrène décrits dans la molécule précédente (Figure V-24).

OUG-8 ($CDCl_3$, 500 MHz)

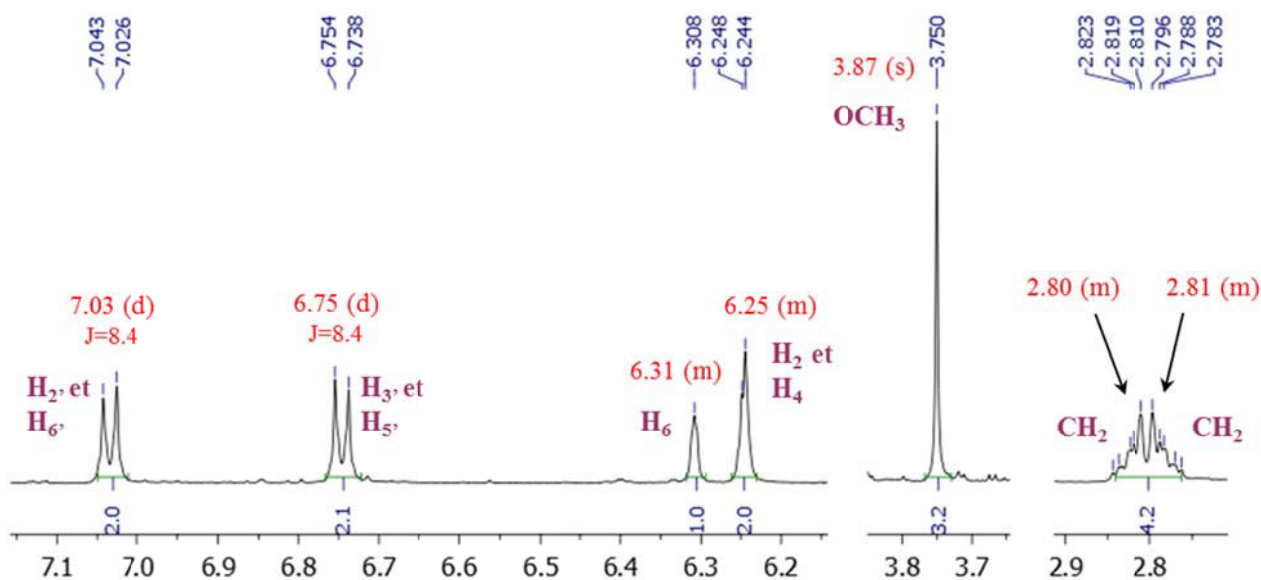


Figure V-24. Spectre RMN 1H (zones 2.7-2.9, 3.7-3.8 et 6.2-7.1 ppm) du composé OUG-8 (500 MHz, $CDCl_3$, δ_{TMS} 0 ppm)

Le spectre RMN ^{13}C nous révèle la présence de 15 carbones. Après analyse des spectres RMN 2D COSY, HMQC et HMBC (spectres en annexe 12 page 375), la structure proposée pour **OUG-8** est le 3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle (ou 3-méthyl-dihydroresvératrol)³⁰⁰ (Figure V-25) de formule $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$.

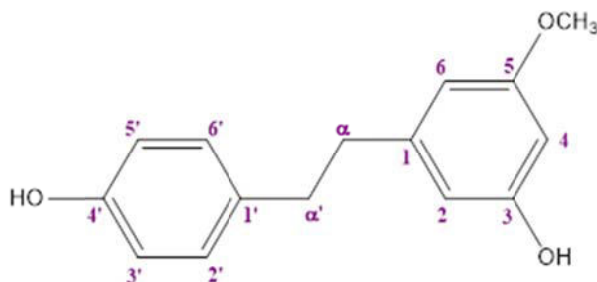


Figure V-25. Structure du 3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle (**OUG-8**)

Les valeurs des données RMN ^1H et ^{13}C (dans CDCl_3) et les corrélations 2D de **OUG-8** sont regroupées dans le tableau V-4 et sur la figure V-26.

Tableau V-4. Données RMN ^1H et ^{13}C (dans CDCl_3) du composé **OUG-8**

Position	OUG-8	
	δH , mult (<i>J</i> en Hz)	δC , mult
1		144.7, qC
2	6.25, m	108.1, CH
3		156.7, qC
4	6.25, m	99.1, CH
5		161.0, qC
6	6.31, m	107.0, CH
1'		134.0, qC
2'	7.03, d (8.4)	129.7, CH
3'	6.75, d (8.4)	115.3, CH
4'		153.8, qC
5'	6.75, d (8.4)	115.3, CH
6'	7.03, d (8.4)	129.7, CH
α	2.80, m*	38.3, CH_2
α'	2.81, m*	36.8, CH_2
OCH_3 -5	3.75, s	55.4, CH_3

* interchangeables

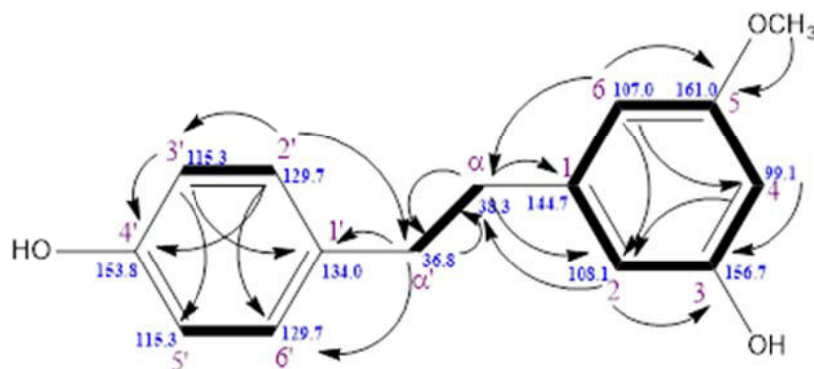


Figure V-26. Corrélations COSY (liaisons en gras) et HMBC (flèches noires) du composé OUG-8

Majumder *et al.* ont identifié cette molécule en 1999 dans un extrait méthanolique de la plante entière de *Dendrobium amoenum* (espèce d'orchidée)³⁰⁰. Cette molécule n'avait jamais précédemment été décrite comme constituant d'une propolis.

b) Extrait OUG-MeOH

- Analyse déréplivative

Tout comme pour l'extrait OUG-DCM, une analyse HPLC/DAD/MS de l'extrait OUG-MeOH a tout d'abord été réalisée. Le chromatogramme HPLC ainsi que les profils UV et données MS des principaux composés sont présentés sur la figure V-27.

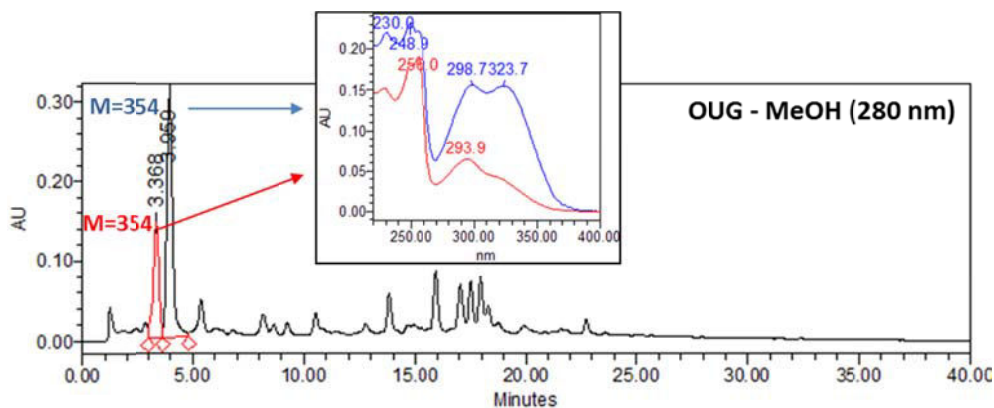


Figure V-27. Chromatogramme HPLC de l'extrait OUG-MeOH (méthode 1, λ 280 nm), profils UV et données MS de ses composés majoritaires

Les données ESI-MS indiquent les m/z suivants :

- Pic à t_R 3.3 min (rouge) : $[M-H]^-$ 353 correspondant à une masse molaire de 354 g/mol
- Pic à t_R 4.0 min (bleu) : $[M+H]^+$ 355, $[M+Na]^+$ 377, $[2M+Na]^+$ 731 soit une masse molaire de 354 g/mol également

Tout comme pour l'extrait OUG-DCM, des purifications ont été nécessaires afin d'identifier ces composés.

- **Purifications par Chromatographie Flash**

La séparation par chromatographie Flash (CF15_OUG-MeOH) a permis d'identifier trois composés **OUG-9**, **OUG-10** et **OUG-11** (et non deux comme le laissait supposer le chromatogramme HPLC de l'extrait OUG-MeOH) grâce aux fractions CF15-A et C.

- **Elucidation structurale des composés OUG-9, OUG-10 et OUG-11 (Fractions CF15-A et C)**

Les données HPLC/UV de la fraction CF15-A sont regroupées sur la figure V-28.

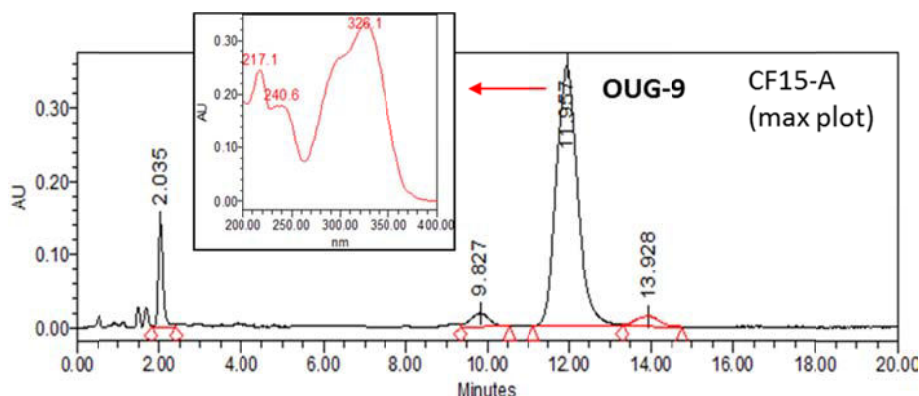


Figure V-28. Chromatogramme HPLC de la fraction CF15-A (méthode 4, max plot) et profil UV du composé OUG-9

Le composé **OUG-9** possède une masse molaire de 354 g/mol et un spectre UV similaire à celui des dérivés de l'acide caféïque. Le spectre RMN ^1H (dans le méthanol deutéré) présente des protons aromatiques (5H) entre δ 6.2 et 7.8 ppm, trois signaux correspondant à des CH porteurs d'un hydroxyle à δ 5.34, 4.17 et 3.73 ppm et deux multiplets (CH_2) à δ 2.20 et 2.07 ppm (Figure V-29).

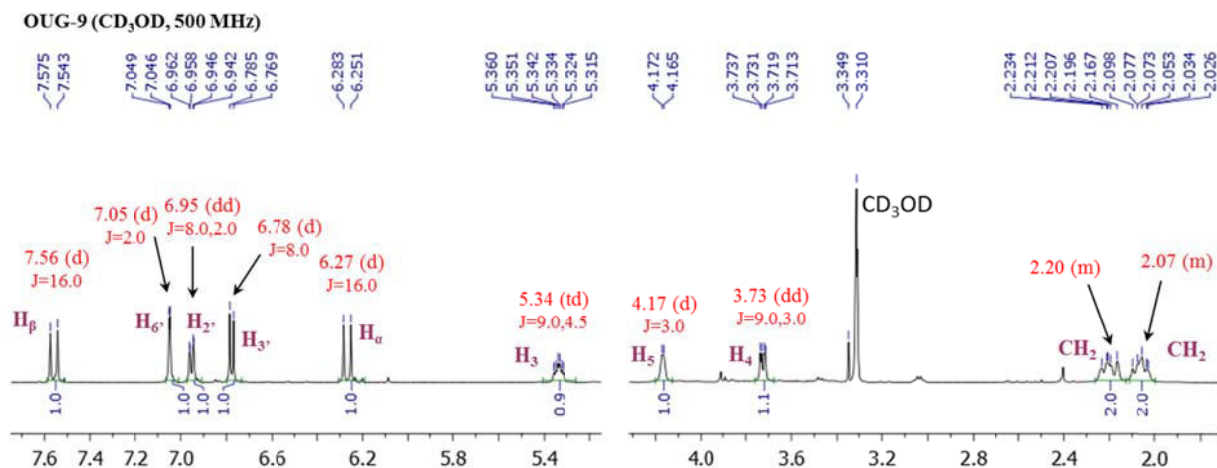


Figure V-29. Spectre RMN ¹H (zones δ 1.9-4.1 et δ 5.3-7.6 ppm) du composé OUG-9 (500 MHz, CD₃OD, δ_{TMS} 0 ppm)

Le spectre RMN ¹³C nous révèle la présence de 16 carbones. Après analyse des spectres RMN 2D COSY, HMQC, HMBC et NOESY (spectres en annexe 13 page 378), la structure proposée pour **OUG-9** est l'acide 3-*O*-caféoylquinique ou acide chlorogénique^{301,302} (Figure V-30) de formule C₁₆H₁₈O₉, déjà connu comme constituant de plusieurs propolis³⁰³⁻³⁰⁵.

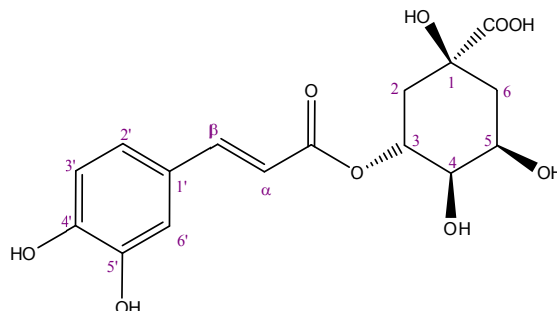


Figure V-30. Structure de l'acide chlorogénique (OUG-9)

Les valeurs des données RMN ¹H et ¹³C (dans CD₃OD) et les corrélations 2D de **OUG-9** sont regroupées dans le tableau V-5 et sur la figure V-31.

Tableau V-5. Données RMN ^1H et ^{13}C (dans CD_3OD) du composé OUG-9

Position	OUG-9	
	δH , mult (J en Hz)	δC , mult
1		76.3, qC
2	2.07, m ^a	38.9 ^a , CH ₂
3	5.34, td (9.0, 4.5)	72.0, CH
4	3.73, dd (9.0, 3.0)	73.6, CH
5	4.17, d (3.0)	71.5, CH
6	2.20, m ^a	38.3 ^a , CH ₂
1'		127.8, qC
2'	6.95, dd (8.0, 2.0)	123.0, CH
3'	6.78, d (8.0)	116.5, CH
4'		149.6, qC
5'		146.8, qC
6'	7.05, d (2.0)	115.3 ^b , CH
α	6.27, d (16.0)	115.2 ^b , CH
β	7.56, d (16.0)	147.1, CH
COOH		177.4, qC
COO		168.7, qC

^{a,b} interchangeables

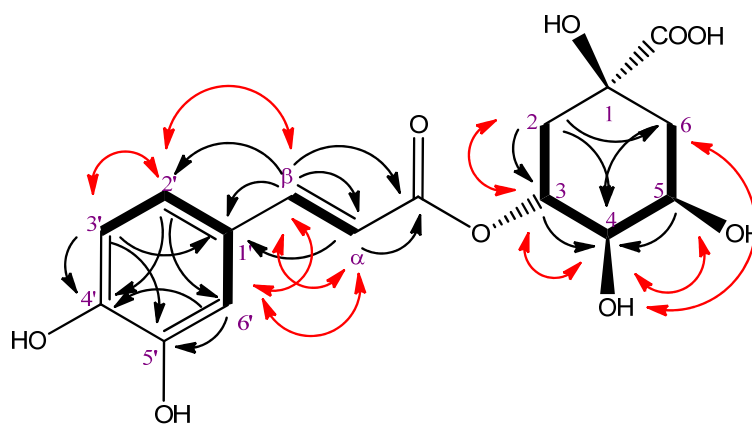


Figure V-31. Corrélations COSY (liaisons en gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé OUG-9

En ce qui concerne **OUG-10** et **OUG-11**, les données HPLC/UV de la fraction CF15-C sont regroupées sur la figure V-32.

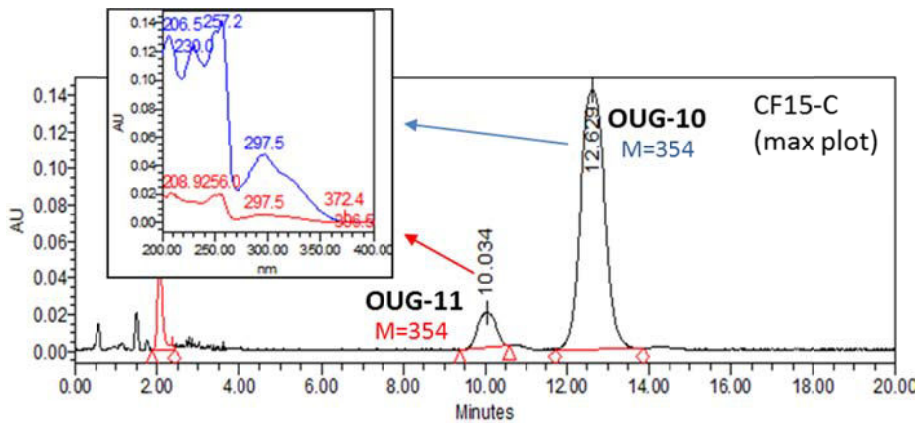


Figure V-32. Chromatogramme HPLC de la fraction CF15-C (méthode 4, max plot) et profils UV des composés **OUG-10** et **OUG-11**

Le composé majoritaire **OUG-10** et le minoritaire **OUG-11** ont tous les deux la même masse molaire ($M=354$ g/mol) et le même profil UV (différent de celui de l'acide chlorogénique), il s'agit donc sans doute d'analogues structuraux. Le spectre RMN ^1H de la fraction CF15-C (dans le méthanol deutéré) présente deux protons "majoritaires" (et deux autres "minoritaires") dans la zone des aromatiques et éthyléniques entre δ 6.0 et 6.4 ppm, sept protons en α d'un hydroxyle entre δ 3.3 et 5.0 ppm et un méthyle "majoritaire" vers δ 2.4 ppm (avec un méthyle "minoritaire" également) (Figure V-33).

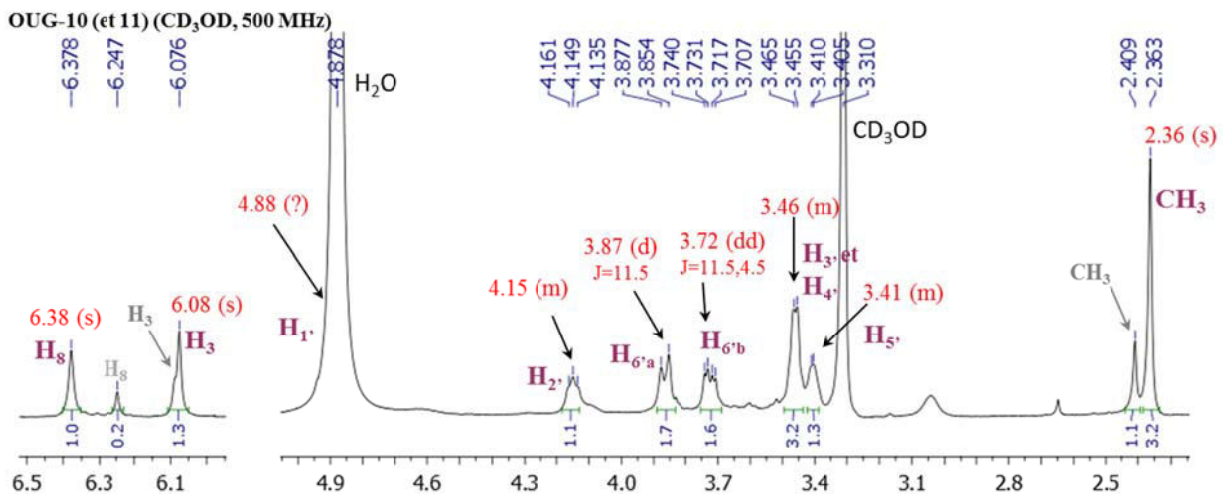


Figure V-33. Spectre RMN ^1H (zones δ 2.3-5.0 et δ 6.0-6.5 ppm) du composé **OUG-10** majoritaire en violet (et **OUG-11** minoritaire en gris) (500 MHz, CD_3OD , δ_{TMS} 0 ppm)

Le spectre RMN ^{13}C nous révèle la présence de 16 carbones. Après analyse des spectres RMN 2D COSY, HMQC et HMBC (spectres en annexe 14 page 381), la structure proposée pour **OUG-10** est la 6- β -C-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-2-méthylchromone soit la biflorine³⁰⁶ (Figure V-34) de formule $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$.

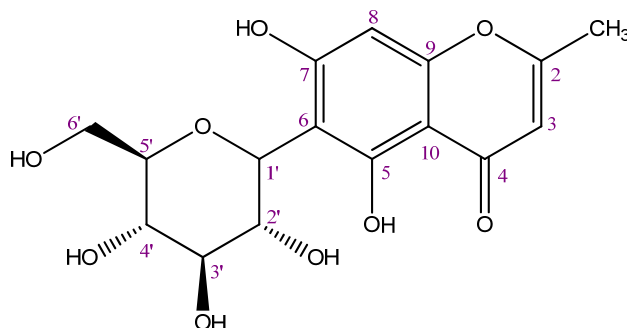


Figure V-34. Structure de la biflorine (**OUG-10**)

Les valeurs des données RMN ^1H et ^{13}C (dans CD_3OD) et les corrélations 2D de **OUG-10** sont regroupées dans le tableau V-6 et sur la figure V-35.

Tableau V-6. Données RMN ^1H et ^{13}C (dans CD_3OD) du composé **OUG-10**

Position	OUG-10	
	δH , mult (J en Hz)	δC , mult
2		169.3, qC
3	6.08, s	109.1, CH
4		184.2, qC
5		162.1, qC
6		109.0, qC
7		164.9, qC
8	6.38, s	95.1, CH
9		159.2, qC
10		104.9, qC
1'	4.88, [d (6.0)]*	75.2, CH
2'	4.15, m	72.5, CH
3'	3.46, m	80.1, CH
4'	3.46, m	71.8, CH
5'	3.41, m	82.6, CH
6'	a 3.87, d (11.5) b 3.72, dd (11.5, 4.5)	62.9, CH_2
CH_3 -2	2.36, s	20.3, CH_3

* Multiplicité déterminée dans $\text{DMSO}-d_6$

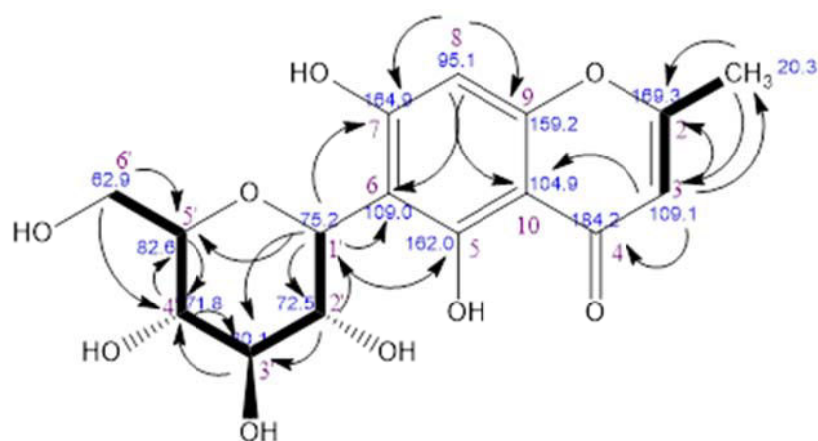


Figure V-35. Corrélations COSY (liaisons en gras) et HMBC (flèches noires) du composé OUG-10

La biflorine a été identifiée pour la première fois dans des bulbes de *Pancratium biflorum* en 1983 par Ghosal *et al.*³⁰⁶. Cette molécule a également été isolée dans une plante endémique de l'est de l'Australie, *Kunzea ambigua*³⁰⁷, de *Eucalyptus cypelloarpa* au Japon³⁰⁸ et de clous de girofle (*Eugenia caryophyllata*) en Chine³⁰⁹. Ce dernier article décrit également l'isobiflorine (la 8- β -C-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-2-méthylchromone), c'est-à-dire le même composé mais substitué en position 8. Ces deux composés étant décrits dans le DMSO-*d*₆, le spectre RMN ¹H de la fraction CF15-C a également été réalisé dans ce solvant. Les valeurs des déplacements chimiques de **OUG-11**, présentées dans le tableau V-7, correspondent bien à celles de l'isobiflorine (Figure V-36).

Tableau V-7. Données RMN ¹H (dans DMSO-*d*₆) des composés OUG-10 et 11

Position	δ H, mult (<i>J</i> en Hz) DMSO- <i>d</i> ₆	
	Biflorine (OUG-10)	Isobiflorine (OUG-11)
3	6.17, s	6.18, s
8	6.38, s	6.24, s
1'	4.55, d (10.0)	4.61, d (10.0)
2'	4.02, t (9.5)	3.87, t (9.5)
3'	3.15, m	3.15, m
4'	3.15, m	3.15, m
5'	3.15, m	3.15, m
6'	a 3.67, d (11.5) b 3.41, dd (11.5, 6.0)	a 3.67, d (11.5) b 3.41, m
CH ₃ -2	2.35, s	2.34, s
OH-5	13.39, s	13.03, s

Les valeurs écrites en rouge correspondent à celles des signaux dont les déplacements chimiques sont différents s'il s'agit de la biflorine ou l'isobiflorine.

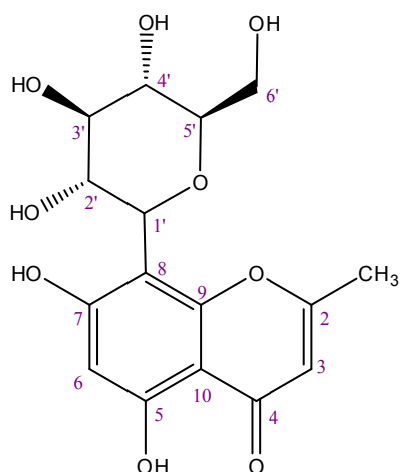


Figure V-36. Structure de l'isobiflorine (OUG-11)

Ces deux molécules n'avaient jamais précédemment été décrites comme constituants d'une propolis.

c) Récapitulatif des cinq molécules identifiées (OUG-7 à 11) après purification

Ainsi, les cinq composés identifiés après purification des extraits DCM et MeOH de la propolis ougandaise peuvent être regroupés dans le chromatogramme HPLC de l'EEP ougandaise (Figure V-37). L'ensemble des données spectrales de ces cinq composés est consultable dans l'annexe 15 page 385.

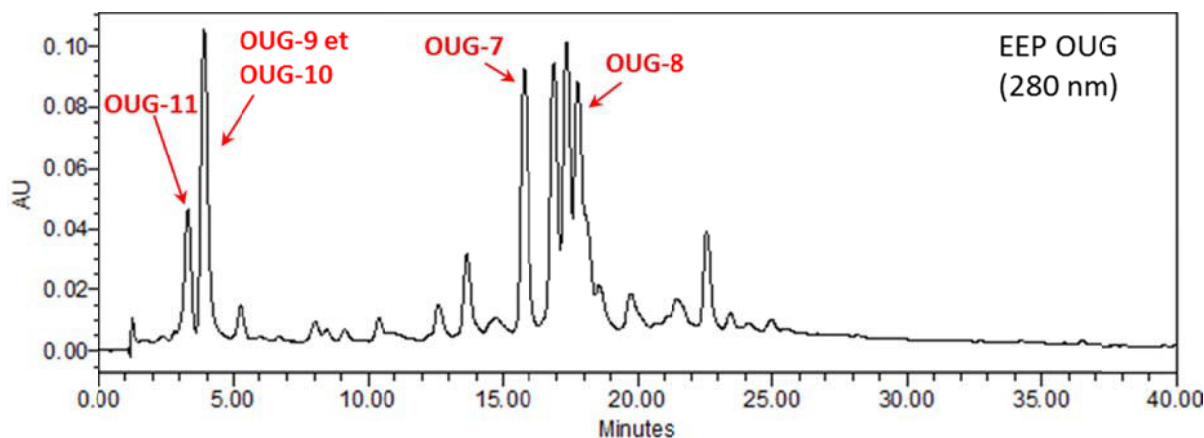


Figure V-37. Chromatogramme HPLC à λ 280 nm de l'EEP ougandaise regroupant les cinq composés identifiés après purification (méthode 1) : **OUG-7** 6-méthoxycoelonine, **OUG-8** 3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle, **OUG-9** acide chlorogénique, **OUG-10** biflorine et **OUG-11** isobiflorine

Bien entendu, plusieurs fractions attendent encore d'être purifiées afin d'identifier d'autres composés contenus dans cette propolis ougandaise.

d) Source botanique probable

Malgré de nombreuses tentatives pour obtenir plus d'informations sur l'échantillon de propolis ougandaise fourni, nous n'avons pu connaître la provenance géographique exacte de cet échantillon ougandais. La carte de l'Ouganda est présentée sur la figure V-38.

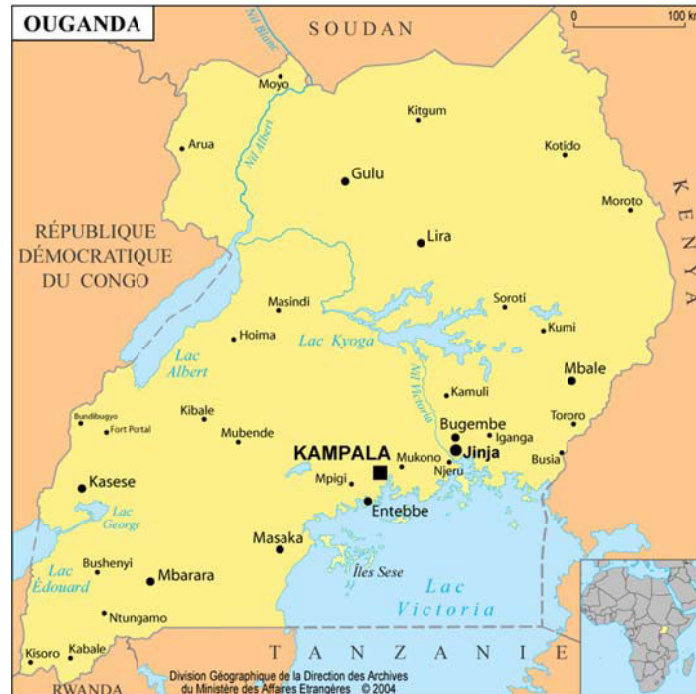


Figure V-38. Carte de l'Ouganda

(Source <http://www.1clic1planet.com/ouganda.htm>)

Cependant, nous avons cherché quelques renseignements sur la flore ougandaise. Elle se compose principalement de savanes et de forêts. Les savanes sont des zones de transition entre le désert et la forêt, où il tombe chaque année entre 500 et 1500 mm de pluie et où alternent saisons humides et périodes de sécheresse. Quand les pluies sont rares, la savane prend l'aspect d'une steppe semi-désertique (brousse) où seuls quelques arbres de 3 à 5 m, majoritairement des acacias (famille des *Fabaceae*) mais aussi des euphorbes candélabres (*Euphorbia candelabrum*) et des arbres à saucisses (*Kigelia africana*), se dressent au milieu des buissons épineux. Quant aux forêts, il en existe deux types. Tout d'abord les forêts pluviales (en faible altitude comme près du lac Victoria) où la flore y est très variée. Les cimes des arbres forment un véritable couvercle qui laisse à peine pénétrer les rayons du soleil. Chaque arbre est alors recouvert d'une multitude d'épiphytes (tels que les orchidées et les fougères) et de lianes. Ensuite les forêts d'altitude, à l'ouest du pays, se caractérisent par une végétation étagée. Entre 1500 et 3000 m, elles se composent de résineux, comme les cèdres, mais tendent à diminuer en raison de l'augmentation des cultures paysannes et des plantations de bananes. Puis vient la végétation de moyenne montagne avec des arbres plus petits, des bruyères et des fougères. Autour de 3500 m, on trouve une forêt dite de nuages : les

arbres sont tous rabougris et totalement recouverts d'épiphytes. Mousses, orchidées, fougères et lichens pendent alors comme des barbes aux branches. Enfin au-delà de 3800 à 4000 m, commence l'étage afro-alpin où foisonnent les buissons d'hélichrysums et de séneçons (famille des *Asteraceae*) ainsi que de lobélies géantes (famille des *Campanulaceae*)³¹⁰.

Les composés majoritaires présents dans la propolis ougandaise sont principalement des triterpènes comme les α et β -amyrines (et leurs dérivés). Ces résultats sont en accord avec ceux de Zhang *et al.* qui avaient décrit les dérivés d'amyrines et de lupéol comme étant les composés majoritaires de cinq propolis ougandaises²⁷⁸. Ces composés ont été retrouvés, entre autres, dans différentes variétés d'acacias comme *Acacia senegal*^{311,312}, *A. tortilis*³¹³, *A. modesta*³¹⁴ et aussi *A. visco*³¹⁵. Ainsi, l'acacia serait une source probable de la propolis ougandaise : en effet, les espèces répertoriées en Ouganda sont *Acacia hockii*, *A. gerrardii*, *A. kirkii subsp. Mildbraedii* et *A. senegal*³¹⁶ et donc susceptibles de contenir ces triterpènes. Les α et β -amyrines peuvent également provenir de différentes espèces d'Euphorbiaceae³¹⁷⁻³¹⁹, cependant, il n'a pas été reporté que *Euphorbia candelabrum* contenait d'amyrines. En ce qui concerne les composés minoritaires, les espèces d'orchidées présentes en Ouganda pourraient en être la source.

4. Activités biologiques

Les trois EEP exotiques ont également été testés sur les quatre activités biologiques évaluées pour la propolis française BFA, et ont été comparés à cette dernière.

4.1. Activités antioxydante et anti-AGEs

4.1.1. Résultats

Le tableau V-8 regroupe les résultats en termes d'activités antioxydante et anti-AGEs pour les quatre propolis.

Tableau V-8. Activités antioxydante et anti-AGEs des quatre propolis (EEP)

Propolis (EEP)	Antioxydant ($\mu\text{mol TE/g}$)	Anti-AGEs (mg/mL)
FRA	1605 \pm 26	0.05
CIV	625 \pm 8	0.10
MEX	Inactif	> 1
OUG	Inactif	0.50
E392	591 \pm 20	-
<i>S. Japonicum</i> /quercétine	-	0.09/0.06

Tout comme précédemment, on peut distinguer deux groupes de propolis : le premier composé des propolis BFA et ivoirienne et le deuxième des propolis mexicaine et ougandaise. Dans le premier groupe, on note que la propolis ivoirienne possède une activité antioxydante proche de celle de l'extrait de romarin (E392) et donc environ trois fois moins grande que celle de la propolis BFA. De même, la propolis ivoirienne possède une bonne activité anti-AGEs, même si elle est deux fois moins importante que celle de la française. En ce qui concerne les propolis mexicaine et ougandaise, aucune d'entre elles n'est antioxydante et ne possède une activité anti-AGEs marquée (activité faible pour OUG).

4.1.2. Discussion

La plus faible capacité antioxydante de la propolis ivoirienne par rapport à la française peut s'expliquer par le taux légèrement plus faible de polyphénols totaux (225 vs 254 $\mu\text{mol TE/g}$) ou encore par le plus faible taux cumulé des 12 marqueurs (103.3 vs 193.3 mg/g). De même, l'activité anti-AGEs de la propolis ivoirienne est plus faible compte tenu d'une moindre teneur en composés les plus actifs (pinobanksine-3-acétate, caféate de prényle, etc.). L'absence d'activité antioxydante pour les propolis mexicaine et ougandaise vient du fait que les composés majoritaires sont des triterpènes et non des polyphénols.

4.2. Activités antifongique et antibactérienne

4.2.1. Résultats

Le tableau V-9 regroupe les résultats des activités antifongiques (sur *Candida albicans*, *C. glabrata* et *Aspergillus fumigatus*) et antibactériennes (sur *Staphylococcus aureus* et ses SARM et SASM) des quatre propolis.

Tableau V-9. Activités antifongique et antibactérienne des quatre propolis (EEP)

Souches antifongiques	Propolis (EEP) / CMI ₈₀ ($\mu\text{g/mL}$)				Amphotéricine B
	FRA	CIV	MEX	OUG	
<i>C. albicans</i>	31	125	> 250	> 250	0.125
<i>C. glabrata</i>	16	31	> 250	250	0.125
<i>A. fumigatus</i>	250	> 250	> 250	> 250	6
Souches anti-bactériennes	Propolis (EEP) / CMI ₁₀₀ ($\mu\text{g/mL}$)				Oxacilline
	FRA ^a	CIV ^b	MEX ^b	OUG ^b	
<i>S. aureus</i>	>100	70	> 110	> 110	≤ 0.25
SARM n°1	>100	70	> 110	> 110	≥ 4
SARM n°2	>100	70	> 110	> 110	≥ 4
SASM n°1	>100	90	> 110	> 110	≤ 0.25
SASM n°2	>100	70	> 110	> 110	≤ 0.25

^a n=3, ^b n=1

La propolis ivoirienne est un peu moins active que la propolis française BFA sur les trois souches antifongiques testées, par contre elle semble plus active sur les souches bactériennes. Les propolis mexicaine et ougandaise, quant à elles, semblent globalement inactives sur ces mêmes souches même si la propolis ougandaise présente une faible activité sur *C. glabrata*.

4.2.2. Discussion

Il est bien connu que la propolis est principalement utilisée par les abeilles comme matériau de défense contre les parasites⁵ et pour prévenir les infections bactériennes et fongiques, et que souvent, tandis que l'activité biologique de différents échantillons de propolis est similaire, les métabolites secondaires responsables de l'activité peuvent être différents^{59,72}. Ainsi, bien que les extraits éthanoliques des propolis (EEP) mexicaine et ougandaise n'aient pas montré d'activités antioxydante ou antimicrobienne importantes, les triterpénoïdes pentacycliques comme les α et β -amyrines et leurs différents dérivés ont précédemment été signalés comme agents antibactériens, antifongiques et cytotoxiques³²⁰⁻³²⁴; ces résultats suggèrent que la composition chimique de la propolis recueillie dans l'état du Quintana Roo au Mexique ou encore en Ouganda est qualitativement et quantitativement d'une importance particulière dans l'interaction écologique qui existe entre les abeilles et les parasites et micro-organismes qui vivent spécifiquement dans ces régions.

5. Conclusion

L'étude de trois autres propolis provenant de régions du monde plus "exotiques" a permis de mettre en évidence les différences de compositions chimiques et d'activités biologiques de ces échantillons en fonction des zones géographiques où ils ont été collectés, et lorsque cela était possible, de les associer à des sources végétales locales.

La propolis mexicaine, collectée dans la péninsule du Yucatán, était composée majoritairement de triterpènes (dérivés d'amyrines et stérols), ce qui était tout à fait inhabituel pour une propolis de cette région. Sa composition chimique a pu être associée à deux espèces arboricoles (*L. latisiliquum* et *B. simaruba*) présentes dans cette zone. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le "Journal of Apicultural research", acceptée le 23/07/2014 (cf. production scientifique page ix).

La propolis ougandaise était constituée des mêmes dérivés triterpéniques (ou similaires : dérivés d'amyrines et du lupéol) en tant que composés majoritaires mais comportait, en plus, des composés polyphénoliques en faible quantité non encore décrits pour la propolis (6-méthoxycoelonine, 3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle, biflorine et isobiflorine). La caractérisation des autres composés présents notamment dans l'extrait OUG-DCM devra être complétée dans l'espoir d'identifier d'autres molécules non décrites dans la propolis ou nouvelles, afin de pouvoir valoriser ces résultats sous forme de publication.

La propolis ivoirienne, quant à elle, présentait une composition chimique proche de celle de la propolis BFA, *i.e.* comportant des acides et esters phénoliques ainsi que des flavonoïdes caractéristiques de propolis de type peuplier. Des études complémentaires vont être menées très prochainement dans le but de rechercher les origines botaniques probables de propolis ivoiriennes en reliant la composition chimique de plusieurs échantillons de propolis provenant de différentes régions de Côte d'Ivoire et les espèces locales susceptibles d'être visitées par les abeilles pour leur production de propolis.

6. Partie expérimentale

6.1. Extractions

6.1.1. Extractions éthanoliques de propolis (EEP)

Il s'agit de la même méthode décrite dans la section 7.3.2 du chapitre II.

6.1.2. Extractions successives

a) Pour 1 g de propolis brute

Il s'agit de la même méthode décrite dans la section 7.3.3 du chapitre II.

b) Pour 25 g de propolis brute (OUG)

- **Extraction par le cyclohexane**

25 g de propolis broyée ont été placés dans un erlenmeyer avec 250 mL de cyclohexane. Après 2h d'agitation, la solution a été filtrée sur fritté (porosité 3) mais ce dernier s'est bouché du fait de la finesse des particules. Le mélange a alors été transféré dans une ampoule à décanter, agité puis laissé à décanter pendant une nuit. Le filtrat a été récupéré puis l'opération a été renouvelée quatre fois. Les cinq filtrats ont été rassemblés, puis évaporés sous pression réduite pour donner un extrait jaune et pâteux (63.1%), contenant les constituants apolaires (cires et triterpènes majoritaires).

- **Extractions par le DCM**

Le résidu issu de l'extraction précédente a été repris dans 150 mL de solvant. Après 2h d'agitation, la solution est laissée à décanter puis filtrée sur papier. L'opération a été renouvelée quatre fois. Les cinq filtrats ont été rassemblés, puis évaporés sous pression réduite pour donner un extrait sec marron clair (4.9%), contenant les composés moyennement polaires.

- **Extractions par le MeOH**

Le résidu issu de l'extraction précédente a été repris dans 100 mL de solvant. Après 2h d'agitation, la solution est laissée à décanter puis filtrée sur papier. L'opération a été renouvelée trois fois. Les quatre filtrats ont été rassemblés, puis évaporés sous pression réduite pour donner un extrait sec marron orangé (3.9%), composé des molécules les plus polaires.

6.2. Dosages et analyses chromatographiques

6.2.1. Dosages des polyphénols totaux

Il s'agit de la même méthode décrite dans la section 7.5.1 du chapitre II.

6.2.2. Analyses CCM

Les analyses par CCM ont été réalisées sur les plaques ALUGRAM Xtra SIL G/UV254, couche 0.20 mm, gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV254. L'éluant utilisé se composait d'un mélange du cyclohexane et d'acétate d'éthyle dans les proportions 85:15 ou 80:20. L'observation a été faite à la lumière UV à 254 nm et la vanilline sulfurique a été utilisée comme révélateur.

6.2.3. Analyses HPLC/DAD (méthode 1)

Il s'agit de la même méthode décrite dans la section 7.4.2 du chapitre II. Les EEP ont tous été analysés à une concentration de 10 mg/mL.

6.2.4. Analyses HPLC/DAD/MS

Il s'agit de la même méthode décrite dans la section 7.4.3 du chapitre II.

6.2.5. Analyses HPLC/DAD et quantification des 12 marqueurs (méthode 2)

Il s'agit de la même méthode décrite dans la section 7.7.1 du chapitre II.

6.2.6. Analyses HPLC/DAD/MS de la propolis ougandaise (méthode 3)

Les conditions sont identiques à celles de la méthode 1 excepté le gradient d'élution : 40-60% (0-20 min), 60-85% B (20-28 min), 85-100% B (28-29 min).

6.2.7. Analyses HPLC/DAD de l'extrait OUG-MeOH (méthode 4)

Les conditions sont identiques à celles de la méthode 1 excepté les conditions d'élution : mode isocratique 85% H₂O+0.1% HCOOH (solvant A)/15% MeOH (solvant B).

6.2.8. Analyses GC/MS

Les analyses GC/MS ont été effectuées à l'Unité de Biotechnologie du CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) à Mérida au Mexique sur des échantillons non dérivés au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse (6890N) couplé à un détecteur de masse 5975B (impact électronique IE) tous deux de la marque Agilent Technologies, avec une colonne J&W Scientific (non

polaire, 100% diméthyl polyxiloxane, 30 m de long, ID 0.32 mm et film 0.5 mm). La programmation de la température était la suivante : 180°C (3 min), 180-280°C (10°C/min pour MEX, et 12.5°C/min pour OUG), 280°C (30 min). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, à un débit de 1.5 mL/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées respectivement à 250°C et 280°C. Les composés ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention et/ou profils de fragmentation en impact électronique avec ceux de produits commerciaux et/ou de molécules incluses dans la banque de données (ChemStation G1701DA, Librairie NIST).

6.2.9. Analyse MS/ionisation chimique (CI)

L'analyse MS du composé OUG-8 a été réalisée au moyen d'un analyseur double secteur Jeol JMS 700 avec une source d'ionisation chimique (gaz réactif isobutane).

6.3. Purifications par chromatographie Flash

Tous les fractionnements et purifications ont été effectués par chromatographie Flash à l'aide de l'appareil CombiFlash Teledyne ISCO.

6.3.1. CF13_MEX-EEP

4.2 g d'EEP mexicaine ont été dissous dans le minimum de DCM dans lesquels ont été ajoutés 8.3 g de silice (extrait:silice 1:2). Le mélange a été évaporé sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le fractionnement a été réalisé à l'aide d'une colonne Redisep Silica 80g (CV 125 mL, 60 mL/min) avec un débit de 35 mL/min en utilisant un gradient de 100% de cyclohexane à 100% d'AcOEt (Volume total = 5L). Le chromatogramme a été enregistré à 254 et 280 nm. 200 tubes ont été collectés et rassemblés en 22 fractions dont trois contiennent les composés majoritaires (A, B et C).

6.3.2. CF14_OUG-DCM

1.0 g d'extrait OUG-DCM a été dissous dans 100 mL de DCM dans lesquels ont été ajoutés 1.5 g de silice. Le mélange a été évaporé sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le fractionnement a été réalisé en phase normale à l'aide d'une colonne Redisep Silica 24g (Volume de colonne 32 mL) avec un débit de 20 mL/min en utilisant les solvants cyclohexane (solvant A) et AcOEt (solvant B). Le gradient d'élution utilisé était le suivant : 5-10% B (25 min), 10-20% (15 min), 20-45% (25 min), 45-50% (10 min), 50-90% (20 min). Le chromatogramme a été enregistré à 254 et 280 nm. 165 tubes ont été collectés et rassemblés en 15 fractions.

6.3.3. CF15_OUG-MeOH

300 mg d'extrait OUG-MeOH ont été dissous dans 20 mL de MeOH dans lesquels ont été ajoutés 600 mg de silice. Le mélange a été évaporé sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le fractionnement a été réalisé en phase inverse à l'aide d'une colonne C18 (Interchim PF-

30C18 HC/6g, 30 μ m) avec un débit de 12 mL/min en utilisant les solvants H₂O (solvant A) et MeOH (solvant B). Le gradient d'éluion utilisé était le suivant : 5-10% B (10 min), 10% (10 min), 10-15% (10 min), 15% (10 min). Le chromatogramme a été enregistré à 254 et 280 nm. 50 tubes ont été collectés et rassemblés en 4 fractions.

6.4. Activités biologiques

Les protocoles pour l'évaluation des activités biologiques des trois propolis du monde sont les mêmes que ceux utilisés pour la propolis française BFA (Chapitre III, section 3).

Bibliographie du chapitre V (273-324)

- (273) Lotti, C.; Campo Fernandez, M.; Piccinelli, A. L.; Cuesta-Rubio, O.; Márquez Hernández, I.; Rastrelli, L. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 2209–2213.
- (274) Tolosa, L.; Canizares, E. The Collection, Characterisation and Evaluation of Antimicrobial of Propolis Extracts from Campeche, Mexico. *Ars Pharmaceutica* **2002**, *43*, 187–204.
- (275) Londono Orozco, A.; Avila Acevedo, J. G.; Canales Martinez, M. M.; Hernandez Delgado, C. T.; Serrano, P. R.; Flores Ortiz, C. M.; Diaz, A. D.; Penieres Carrillo, J. G.; Garcia Tovar, C. G.; Cruz Sanchez, T. A. Antibacterial Comparative Study Between Extracts of Mexican Propolis and of Three Plants Which Use Apis Mellifera for Its Production. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **2010**, *9*, 1250–1254.
- (276) Almutairi, S.; Eapen, B.; Chundi, S. M.; Akhalil, A.; Siheri, W.; Clements, C.; Fearnley, J.; Watson, D. G.; Edrada-Ebel, R. New Anti-Trypanosomal Active Prenylated Compounds from African Propolis. *Phytochemistry Letters* **2014**, *10*, 35–39.
- (277) Kardar, M. N.; Zhang, T.; Coxon, G. D.; Watson, D. G.; Fearnley, J.; Seidel, V. Characterisation of Triterpenes and New Phenolic Lipids in Cameroonian Propolis. *Phytochemistry* **2014**, *106*, 156–163.
- (278) Zhang, T.; Omar, R.; Siheri, W.; Al Mutairi, S.; Clements, C.; Fearnley, J.; Edrada-Ebel, R.; Watson, D. Chromatographic Analysis with Different Detectors in the Chemical Characterisation and Dereplication of African Propolis. *Talanta* **2014**, *120*, 181–190.
- (279) Haile, K.; Dekebo, A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Haramaya Propolis (bee Glue), Ethiopia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2013**, *4*, 734–740.
- (280) Furukawa, S.; Takagi, N.; Ikeda, T.; Ono, M.; Nafady, A. M.; Nohara, T.; Sugimoto, H.; Doi, S.; Yamada, H. Two Novel Long-Chain Alkanoic Acid Esters of Lupeol from Alecrim-Propolis. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2002**, *50*, 439–440.
- (281) Ito, J.; Chang, F.-R.; Wang, H.-K.; Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K.-H. Anti-AIDS Agents. 48.1 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *Journal of Natural Products* **2001**, *64*, 1278–1281.
- (282) Negri, G.; Salatino, M. L. F.; Salatino, A. Unusual Chemical Composition of a Sample of Brazilian Propolis, as Assessed by Analysis of a Chloroform Extract - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research* **2003**, *42*, 53–56.
- (283) Negri, G.; Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F. Comb and Propolis Waxes from Brazil: Triterpenoids in Propolis Waxes - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research* **2000**, *39*, 86–88.
- (284) Schultz, G. P. Vascular Flora of the El Edén Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico1. *The Journal of the Torrey Botanical Society* **2009**, *132*, 311–322.
- (285) Peraza-Sánchez, S. R.; Peña-Rodríguez, L. M. Isolation of Picropolygamain from the Resin of *Bursera Simaruba*. *Journal of Natural Products* **1992**, *55*, 1768–1771.
- (286) Peraza-Sánchez, S. R.; Salazar-Aguilar, N. E.; Peña-Rodríguez, L. M. A New Triterpene from the Resin of *Bursera Simaruba*. *Journal of Natural Products* **1995**, *58*, 271–274.
- (287) Adelmann, J.; Passos, M.; Breyer, D. H.; Dos Santos, M. H. R.; Lenz, C.; Leite, N. F.; Lanças, F. M.; Fontana, J. D. Exotic Flora Dependence of an Unusual Brazilian Propolis: The Pinocembrin Biomarker by Capillary Techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2007**, *43*, 174–178.
- (288) Ouattara, N. Situation des ressources génétiques forestières de la Côte d'Ivoire (Zone de savanes), 2001.
- (289) Guillaumet, J.-L.; Adjanohoun, E. La végétation de la Côte d'Ivoire. In *Le milieu naturel de la Côte d'Ivoire*; ORSTOM: Paris, 1971; pp. 161–263.

- (290) Garba, S.; Andrew, K.; Gayus, J. Antibacterial Activities of Total Alkaloids Extracted from Some Medicinal Plants. *Topclass Journal of Herbal Medicine* **2013**, *2*, 217–222.
- (291) Falodun, A.; Obasuyi, O. Phytochemical Screening and Evaluation of Stem Bark Extract of *Khaya Senegalensis* (Meliaceae) on Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Canadian. *Journal of Pure and Applied Sciences* **2009**, *31*, 925–928.
- (292) Ademola, I. O.; Fagbemi, B. O.; Idowu, S. O. Bioseparation and Activity of *Khaya Senegalensis* Fractions against Infective Larvae of *Haemonchus Contortus*. *Veterinary Parasitology* **2009**, *165*, 170–174.
- (293) Accioly, M. P.; Bevilaqua, C. M. L.; Rondon, F. C. M.; de Moraes, S. M.; Machado, L. K. A.; Almeida, C. A.; de Andrade Jr., H. F.; Cardoso, R. P. A. Leishmanicidal Activity in Vitro of *Musa Paradisiaca* L. and *Spondias Mombin* L. Fractions. *Veterinary Parasitology* **2012**, *187*, 79–84.
- (294) Soni, H.; Patel, S. S.; Mishra, K.; Nayak, G.; Singhai, A. K.; Pathak, A. K. Preliminary Pharmacognostical and Phytochemical Investigations of *Tamarindus Indica* Linn. Seeds. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* **2011**, *1*, 59–63.
- (295) Konaté, K.; Yomalan, K.; Sytar, O.; Zerbo, P.; Brestic, M.; Patrick, V. D.; Gagnic, P.; Barro, N. Free Radicals Scavenging Capacity, Antidiabetic and Antihypertensive Activities of Flavonoid-Rich Fractions from Leaves of *Trichilia Emetica* and *Opilia Amentacea* in an Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, *2014*, e867075.
- (296) Park, B.-Y.; Min, B.-S.; Kwon, O.-K.; Oh, S.-R.; Ahn, K.-S.; Kim, T.-J.; Kim, D.-Y.; Bae, K.; Lee, H.-K. Increase of Caspase-3 Activity by Lignans from *Machilus Thunbergii* in HL-60 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *27*, 1305–1307.
- (297) Beutler, J. A.; Shoemaker, R. H.; Johnson, T.; Boyd, M. R. Cytotoxic Geranyl Stilbenes from *Macaranga Schweinfurthii*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 1509–1512.
- (298) Leong, Y.-W.; Kang, C.-C.; Harrison, L. J.; Powell, A. D. Phenanthrenes, Dihydrophenanthrenes and Bibenzyls from the Orchid *Bulbophyllum Vaginatium*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 157–165.
- (299) Katerere, D. R.; Gray, A. I.; Nash, R. J.; Waigh, R. D. Phytochemical and Antimicrobial Investigations of Stilbenoids and Flavonoids Isolated from Three Species of Combretaceae. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 932–940.
- (300) Majumder, P. L.; Guha, S.; Sen, S. Bibenzyl Derivatives from the Orchid *Dendrobium Amoenum*. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1365–1369.
- (301) Morishita, H.; Iwahashi, H.; Osaka, N.; Kido, R. Chromatographic Separation and Identification of Naturally Occurring Chlorogenic Acids by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1984**, *315*, 253–260.
- (302) Iwai, K.; Kishimoto, N.; Kakino, Y.; Mochida, K.; Fujita, T. In Vitro Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seven Hydroxycinnamoyl Derivatives in Green Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 4893–4898.
- (303) Erdogan, S.; Ates, B.; Durmaz, G.; Yilmaz, I.; Seckin, T. Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Anatolia Propolis and Their Radical Scavenging Capacities. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 1592–1597.
- (304) Fernandes-Silva, C. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F.; Breyer, E. D. H.; Negri, G. Chemical Profiling of Six Samples of Brazilian Propolis. *Química Nova* **2013**, *36*, 237–240.
- (305) Meneghelli, C.; Joaquim, L. S. D.; Félix, G. L. Q.; Somensi, A.; Tomazzoli, M.; da Silva, D. A.; Berti, F. V.; Veleirinho, M. B. R.; Recouvreux, D. de O. S.; de Mattos Zeri, A. C.; Dias, P. F.; Maraschin, M. Southern Brazilian Autumnal Propolis Shows Anti-Angiogenic Activity: An in Vitro and in Vivo Study. *Microvascular Research* **2013**, *88*, 1–11.
- (306) Ghosal, S.; Kumar, Y.; Singh, S.; Ahad, K. Biflorin, a Chromone-C-Glucoside from *Pancreatium Biflorum*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2591–2593.
- (307) Ito, H.; Kasajima, N.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Yoshida, T. Dimeric Flavonol Glycoside and Galloylated C-Glucosylchromones from *Kunzea Ambigua*. *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 411–415.

- (308) Ito, H.; Koreishi, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Yoshida, T. Cypellocarpins A–C, Phenol Glycosides Esterified with Oleuropeic Acid, from Eucalyptus Cypellocarpa. *Journal of Natural Products* **2000**, *63*, 1253–1257.
- (309) Zhang, Y.; Chen, Y. Isobiflorin, a Chromone C-Glucoside from Cloves (*Eugenia Caryophyllata*). *Phytochemistry* **1997**, *45*, 401–403.
- (310) Auzias, D.; Labourdette, J.-P. *Ouganda 2013-14*; Petit Futé, 2012.
- (311) Saharia, G. S.; Sharma, M. Chemical Examination of Acacia Senegal Willd. *Indian Journal of Forestry* **1981**, *4*, 63.
- (312) Jain, R.; Sharma, P.; Bhagchandani, T.; Jain, S. C. Phytochemical Investigation and Antimicrobial Activity of Acacia Senegal Root Heartwood. *Journal of Pharmacy Research* **2012**, *5*, 4934–4938.
- (313) Prakash, L.; Singh, M. Triterpenoids and Other Constituents of Acacia Tortilis Wild. *Journal of the Indian Chemical Society* **1986**, *63*, 853–854.
- (314) Joshi, K. C.; Tholia, M. K.; Sharma, T. Chemical Examination of Acacia Modesta. *Planta Medica* **1975**, *27*, 281–283.
- (315) Pedernera, A. M.; Guardia, T.; Calderón, C. E. G.; Rotelli, A. E.; Rocha, N. E. de la; Saad, J. R.; Verrilli, M. A. L.; Aseff, S. G.; Pelzer, L. E. Anti-Inflammatory Effect of Acacia Visco Extracts in Animal Models. *Inflammopharmacology* **2010**, *18*, 253–260.
- (316) White, F. *La Vegetation de L'Afrique (The Vegetation of Africa)*; IRD Editions, 1986.
- (317) Shih, M.-F.; Cheng, Y.-D.; Shen, C.-R.; Cherng, J.-Y. A Molecular Pharmacology Study into the Anti-Inflammatory Actions of Euphorbia Hirta L. on the LPS-Induced RAW 264.7 Cells through Selective iNOS Protein Inhibition. *Journal of Natural Medicines* **2010**, *64*, 330–335.
- (318) Guelz, P. G.; Bodden, J.; Mueller, E.; Marner, F. J. Epicuticular Wax of Euphorbia Aphylla Brouss. Ex. Willd., Euphorbiaceae. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **1988**, *43*, 19–23.
- (319) Awad, N. E.; Abou Zeid, A. H. S.; El-Missiry, M. M. Constituents of the Hexane Extract of the Latex of Euphorbia Pseudocactus A. Berger. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)* **1993**, *31*, 257–258.
- (320) Choi, J. W.; Cho, E. J.; Lee, D. G.; Choi, K.; Ku, J.; Park, K.-W.; Lee, S. Antibacterial Activity of Triterpenoids from Clerodendron Trichotomum. *Journal of Applied Biological Chemistry* **2012**, *55*, 169–172.
- (321) Chung, P. Y.; Chung, L. Y.; Navaratnam, P. Transcriptional Profiles of the Response of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus to Pentacyclic Triterpenoids. *PLoS One* **2013**, *8*, e56687.
- (322) Cota, B. B.; Johann, S.; Oliveira, D. M.; Siqueira, E. P.; Souza-Fagundes, E. M.; Cisalpino, P. S.; Alves, T. M. A.; Zani, C. L. Biological Potential of Stillingia Oppositifolia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 70–77.
- (323) Irshad, M.; Ahmad, A.; Zafaryab, M.; Ahmad, F.; Manzoor, N.; Singh, M.; Rizvi, M. M. A. Composition of Cassia Fistula Oil and Its Antifungal Activity by Disrupting Ergosterol Biosynthesis. *Natural product communications* **2013**, *8*, 261–264.
- (324) Sharma, S.; Singh, T.; Vijayvergia, R. Antimicrobial Properties of Beta-Amyrin (Terpenoid). *JPR: BioMedRx: An International Journal* **2010**, *3*, 1979–1980.

Conclusion générale

Conclusion générale

Au début de ce travail de thèse, nous avons choisi d'appliquer la méthode du "pooling" et donc de travailler sur un mélange de plusieurs lots de propolis dans le but d'obtenir un échantillon moyen, représentatif de la propolis de l'entreprise Ballot-Flurin (BFA). Cette technique de mélange des lots est désormais appliquée au sein de l'entreprise afin de réaliser, dans une optique de standardisation, des extraits plus homogènes. En effet, Apimondia (www.apimondia.com) *i.e.* la Fédération Internationale des Associations d'Apiculteurs et des autres organisations travaillant dans le secteur apicole, a très récemment initié une réflexion sur une certification des différents produits de la ruche, dont la propolis, et BFA participe activement aux travaux des différentes commissions ainsi constituées et notamment à celle d'apithérapie.

La caractérisation chimique fine de la propolis BFA a confirmé qu'elle appartenait bien au type peuplier puisqu'elle est constituée de ses marqueurs spécifiques, notamment les acides phénoliques (acides caféique, *p*-coumarique, férulique, etc.), les esters phénoliques (caféates de prényle, CAPE, etc.) et les flavonoïdes (pinoembrine, pinobanksine-3-acétate, chrysine, galangine, etc.). Deux nouveaux flavonoïdes ont également été identifiés : la 6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-èn-1-yl]pinoembrine (**41**) et la 8-[(E)-phénylprop-2-èn-1-one]-5-méthoxycatéchine (**43**). Parmi ces deux derniers composés, **43** qui apparaît dans une grande majorité des lots constituant le mélange initial de propolis BFA pourrait donc être considéré comme un marqueur spécifique de la propolis de BFA ou, plus largement, d'une zone spécifique d'Europe de l'Ouest. Pour étudier cette éventualité, des études complémentaires devront être menées afin de vérifier la présence ou non de ce marqueur dans des échantillons de propolis provenant de différentes régions d'Europe.

Quatre activités biologiques : antioxydante, antiglycane, antifongique et antibactérienne, ont été évaluées pour cette propolis BFA. Les résultats ont montré que les extraits organiques possédaient une bonne activité antioxydante associée à un potentiel antiglycant très intéressant. Ainsi ces extraits de propolis pourraient-ils entrer dans la composition de compléments alimentaires destinés à prévenir la glycoxydation. Du point de vue de la relation composition-activité, alors que les taux de polyphénols totaux des extraits de propolis sont corrélés positivement avec l'activité antioxydante mesurée, une telle corrélation n'est pas observée entre ces mêmes taux et l'activité anti-AGEs. En effet, un taux important de polyphénols spécifiques, les flavonoïdes, semble ici nécessaire pour observer une activité anti-AGEs marquée. Il existe en effet deux principales voies d'inhibition de la formation des AGEs : la première passe par le piégeage de radicaux libres et/ou la chélation de métaux de transition, limitant alors la formation d'espèces réactives de l'oxygène et

prévenant ainsi celle des intermédiaires dicarbonylés, précurseurs des AGEs ; la deuxième, correspond au piégeage des intermédiaires dicarbonylés eux-mêmes (cf. figure III-12 page 137). Nous nous sommes alors intéressés à l'étude de ce second mécanisme puisque nos résultats ont montré que la pinobanksine-3-acétate, composé majoritaire des extraits organiques de propolis BFA, présentait la meilleure activité anti-AGEs alors que son potentiel antioxydant était quasi nul. L'activité antiglycane de cette molécule pourrait donc être liée à sa capacité à piéger les intermédiaires dicarbonylés. Afin de valider cette hypothèse, et de proposer un mécanisme d'action ou de relations structure-activité, une méthode par HPLC permettant d'évaluer la capacité de différents extraits ou molécules à piéger les composés dicarbonylés tels que le méthylglyoxal est actuellement en cours de développement au sein de notre laboratoire. Les extraits de propolis ainsi que les constituants présentant les meilleures activités anti-AGEs sont en cours d'analyse. En ce qui concerne les dérivés de la pinobanksine, les premiers résultats ainsi obtenus indiquent un taux de piégeage du méthylglyoxal de plus de 80%, ce qui confirmerait l'hypothèse émise.

La propolis BFA présente également des activités antifongique et antibactérienne intéressantes, respectivement contre deux levures du genre *Candida* et contre *Staphylococcus aureus* et plusieurs souches SARM et SASM. Les résultats obtenus à partir de différents extraits montrent que ces activités sont d'autant plus marquées que les taux de polyphénols totaux et de flavonoïdes sont élevés. De plus, ces familles de composés agiraient de façon synergique car les extraits de propolis présentent de meilleures activités antibactériennes que leurs constituants pris individuellement. Ce sont ici les extraits à base de DCM, malheureusement peu adaptés à un usage thérapeutique, qui présentent les meilleures activités antibactériennes contre *S. aureus* et plusieurs de ses souches résistantes et sensibles à la méticilline, responsables de nombreuses infections nosocomiales. Il conviendrait donc de développer des extractions alternatives, faisant recours à des solvants non toxiques et écologiques (agrosolvants), permettant d'obtenir des extraits de composition similaire à celle des extraits à base de DCM (e.g. eau subcritique). La propolis de type peuplier présente en effet un réel potentiel dans la lutte contre les infections à staphylocoques.

En complément de l'étude du mélange moyen de la propolis BFA, celle des 24 lots individuels constituant ce "pooling" a permis d'évaluer la variabilité inter-lots en termes de composition chimique et d'activités biologiques (antioxydante et antiglycane). Compte tenu du caractère confidentiel de cette partie, les résultats ne seront pas explicités dans cette conclusion. L'entreprise BFA souhaitait également optimiser son procédé d'extraction aqueuse. Une étude par plan d'expériences a permis d'apporter des éléments importants qui seront très prochainement pris en compte en production chez Ballot-Flurin.

Enfin, l'analyse de trois propolis provenant des continents américain et africain a montré de réelles diversités en termes de compositions chimiques et d'activités biologiques, offrant de belles perspectives de valorisation. Mais cette grande diversité de composition qui se révèle en fonction des zones géographiques implique aussi que la propolis soit un matériau difficile à standardiser. Aujourd'hui, la propolis est décrite dans une fiche à la pharmacopée française mais uniquement en tant que "Propolis pour préparations homéopathiques"³²⁵. Cette fiche contient une brève description de la matière, des tests de solubilité dans l'eau et de détection de polyphénols par réaction avec le chlorure ferrique, et une caractérisation par CCM, mais sans en préciser le type. La propolis n'est par ailleurs pas décrite dans la pharmacopée européenne. A défaut de pouvoir standardiser "la" propolis en général, il serait donc sans doute possible de proposer des normes de standardisation applicables aux différents types de propolis. En Europe, l'équipe de Bankova travaillent déjà, depuis plusieurs années, dans cette optique et notamment sur la propolis de type peuplier mais de nombreuses études restent encore à mener pour aboutir à la standardisation des autres types recensés. Au vu de ce travail et de l'intérêt démontré de la propolis BFA, nous pourrions associer nos efforts à ceux de l'équipe précitée dans l'optique de proposer une monographie européenne de la propolis de type "peuplier".

Bibliographie de la conclusion générale (325)

- (325) Propolis Pour Préparations Homéopathiques, In: Pharmacopée française, 11^{ème} édition, **2012**. Disponible en ligne sur le site www.ansm.sante.fr

Bibliographie générale

Bibliographie générale

- (1) Cardinault, N.; Cayeux, M.-O.; Sert, P. P. du. La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie* **2012**, *10*, 298–304.
- (2) Bankova, V.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie* **2000**, *31*, 3–15.
- (3) Marcucci, M. C. Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie* **1995**, *26*, 83–99.
- (4) Bankova, V.; Popova, M.; Trusheva, B. Plant Sources of Propolis: An Update from a Chemist's Point of View. *Natural Product Communications* **2006**, *1*, 1023–1028.
- (5) Salatino, A.; Fernandes-Silva, C. C.; Righi, A. A.; Salatino, M. L. F. Propolis Research and the Chemistry of Plant Products. *Natural Product Reports* **2011**, *28*, 925–936.
- (6) Cottica, S. M.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Franco, S. L.; Zeoula, L. M.; Visentainer, J. V. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2011**, *22*, 929–935.
- (7) Miguel, M. G.; Nunes, S.; Dandlen, S. A.; Cavaco, A. M.; Antunes, M. D. Phenols and Antioxidant Activity of Hydro-Alcoholic Extracts of Propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 3418–3423.
- (8) Gülçin, İ.; Bursal, E.; Şehitoğlu, M. H.; Bilsel, M.; Gören, A. C. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Lyophilized Aqueous Extract of Propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 2227–2238.
- (9) Ota, C.; Unterkircher, C.; Fantinato, V.; Shimizu, M. T. Antifungal Activity of Propolis on Different Species of Candida. *Mycoses* **2001**, *44*, 375–378.
- (10) Sawaya, A. C. H. F.; Palma, A. M.; Caetano, F. M.; Marcucci, M. C.; Da Silva Cunha, I. B.; Araujo, C. E. P.; Shimizu, M. T. Comparative Study of in Vitro Methods Used to Analyse the Activity of Propolis Extracts with Different Compositions against Species of Candida. *Letters in Applied Microbiology* **2002**, *35*, 203–207.
- (11) Raghukumar, R.; Vali, L.; Watson, D.; Fearnley, J.; Seidel, V. Antimethicillin-resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Activity of “Pacific Propolis” and Isolated Prenylflavanones. *Phytotherapy Research* **2010**, *24*, 1181–1187.
- (12) Kujungiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin. *Journal of Ethnopharmacology* **1999**, *64*, 235–240.
- (13) Nolkemper, S.; Reichling, J.; Sensch, K. H.; Schnitzler, P. Mechanism of Herpes Simplex Virus Type 2 Suppression by Propolis Extracts. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 132–138.
- (14) Ramos, A. F. N.; Miranda, J. L. Propolis: A Review of Its Anti-Inflammatory and Healing Actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **2007**, *13*, 697–710.
- (15) Carvalho, A. A.; Finger, D.; Machado, C. S.; Schmidt, E. M.; Costa, P. M. da; Alves, A. P. N. N.; Morais, T. M. F.; Queiroz, M. G. R. de; Quináia, S. P.; Rosa, M. R. da; Santos, J. M. T. dos; Pessoa, C.; Moraes, M. O. de; Costa-Lotufo, L. V.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Torres, Y. R. In Vivo Antitumoural Activity and Composition of an Oil Extract of Brazilian Propolis. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1239–1245.
- (16) Ballot-flurin, C. Method to treat propolis. 20100135920, 2010.
- (17) Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia* **2002**, *73*, Supplement 1, S1–S6.
- (18) Donadieu, Y. *Naturellement vôtre avec ... La propolis*; Naturellement vôtre avec...; Dangles.; France, 2008.
- (19) Chauvin, R. *Traité de biologie de l'abeille*; Masson, 1968.
- (20) Aagaard, K. L. *The Natural Product: Propolis, the Way to Health*; Mentor: Danemark, 1974.
- (21) Coneac, G.; Gafitanu, E.; Hadaruga, N. G.; Hadaruga, D. I.; Ravis, A.; Bandur, G.; Pinzaru, I. A.; Rusu, G.; Ursica, L.; Paunescu, V.; Gruia, A.; Sebesan, M.; Grozescu, I.; Lazau, C.; Sfirloaga, P. Propolis extract/beta-cyclodextrin nanoparticles: synthesis, physico-chemical, and multivariate analyses. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* **2008**, *14*, 58–70.
- (22) Biscaia, D.; Ferreira, S. R. S. Propolis Extracts Obtained by Low Pressure Methods and Supercritical Fluid Extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *51*, 17–23.

- (23) Bonvehí, J.; Gutiérrez, A. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2011**, *88*, 1387–1395.
- (24) Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Usui, Y.; Nakamura, J.; Matsuka, M.; Zhu, F.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1383–1392.
- (25) Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A. G.; Marcuzzan, G. L.; Bogdanov, S. Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochemical Analysis* **2004**, *15*, 235–240.
- (26) Laskar, R. A.; Sk, I.; Roy, N.; Begum, N. A. Antioxidant Activity of Indian Propolis and Its Chemical Constituents. *Food Chemistry* **2010**, *122*, 233–237.
- (27) Mello, B. C. B. S.; Petrus, J. C. C.; Hubinger, M. D. Concentration of Flavonoids and Phenolic Compounds in Aqueous and Ethanolic Propolis Extracts through Nanofiltration. *Journal of Food Engineering* **2010**, *96*, 533–539.
- (28) Barbarić, M.; Mišković, K.; Bojić, M.; Lončar, M. B.; Smolčić-Bubalo, A.; Debeljak, Ž.; Medić-Šarić, M. Chemical Composition of the Ethanolic Propolis Extracts and Its Effect on HeLa Cells. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *135*, 772–778.
- (29) Piccinelli, A. L.; Lotti, C.; Campone, L.; Cuesta-Rubio, O.; Campo Fernandez, M.; Rastrelli, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 6484–6491.
- (30) Szliszka, E.; Zydowicz, G.; Janoszka, B.; Dobosz, C.; Kowalczyk-Ziomek, G.; Krol, W. Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis Sensitizes Prostate Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis. *International Journal of Oncology* **2011**, *38*, 941–953.
- (31) Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Esumi, H.; Kadota, S. Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Natural Products* **2010**, *73*, 623–627.
- (32) Agüero, M. B.; Gonzalez, M.; Lima, B.; Svetaz, L.; Sánchez, M.; Zacchino, S.; Feresin, G. E.; Schmeda-Hirschmann, G.; Palermo, J.; Wunderlin, D.; Tapia, A. Argentinean Propolis from *Zuccagnia Punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *58*, 194–201.
- (33) Sulaiman, G. M.; Sammarrae, K. W. A.; Ad'hiah, A. H.; Zucchetti, M.; Frapolli, R.; Bello, E.; Erba, E.; D'Incalci, M.; Bagnati, R. Chemical Characterization of Iraqi Propolis Samples and Assessing Their Antioxidant Potentials. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 2415–2421.
- (34) Park, Y. K.; Ikegaki, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1998**, *62*, 2230–2232.
- (35) Paviani, L. C.; Dariva, C.; Marcucci, M. C.; Cabral, F. A. Supercritical Carbon Dioxide Selectivity to Fractionate Phenolic Compounds from the Dry Ethanolic Extract of Propolis. *Journal of Food Process Engineering* **2010**, *33*, 15–27.
- (36) Volpi, N.; Bergonzini, G. Analysis of Flavonoids from Propolis by on-Line HPLC–electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *42*, 354–361.
- (37) Rebiai, A.; Lanez, T.; Belfar, M. L. In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity of Algerian Propolis by Spectrophotometrical and Electrochemical Assays. *International Journal of Pharmacology* **2011**, *7*, 113–118.
- (38) Popova, M.; Silici, S.; Kaftanoglu, O.; Bankova, V. Antibacterial Activity of Turkish Propolis and Its Qualitative and Quantitative Chemical Composition. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 221–228.
- (39) Warakomska, Z.; Maciejewicz, W. Microscopic Analysis of Propolis from Polish Regions. *Apidologie* **1992**, *23*, 277–283.
- (40) Popova, M.; Trusheva, B.; Antonova, D.; Cutajar, S.; Mifsud, D.; Farrugia, C.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H.; Bankova, V. The Specific Chemical Profile of Mediterranean Propolis from Malta. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1431–1435.
- (41) Gómez-Caravaca, A. M.; Gómez-Romero, M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Products Derived from Bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41*, 1220–1234.
- (42) Kalogeropoulos, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtzinis, I.; Karathanos, V. T. Chemical Composition, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Propolis Extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* **2009**, *116*, 452–461.
- (43) Sawaya, A. C.; Cunha, I. B. da S.; Marcucci, M. C. Analytical Methods Applied to Diverse Types of Brazilian Propolis. *Chemistry Central Journal* **2011**, *5*, 27.

- (44) Mohammadzadeh, S.; Shariatpanahi, M.; Hamed, M.; Ahmadkhaniha, R.; Samadi, N.; Ostad, S. N. Chemical Composition, Oral Toxicity and Antimicrobial Activity of Iranian Propolis. *Food Chemistry* **2007**, *103*, 1097–1103.
- (45) Velazquez, C.; Navarro, M.; Acosta, A.; Angulo, A.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Robles-Zepeda, R.; Lugo, E.; Goycoolea, F. M.; Velazquez, E. F.; Astiazaran, H.; Hernandez, J. Antibacterial and Free-radical Scavenging Activities of Sonoran Propolis. *Journal of Applied Microbiology* **2007**, *103*, 1747–1756.
- (46) Midorikawa, K.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Nagaoka, T.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A. G.; Kadota, S. Liquid Chromatography–mass Spectrometry Analysis of Propolis. *Phytochemical Analysis* **2001**, *12*, 366–373.
- (47) Woisky, R. G.; Salatino, A. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *Journal of Agricultural Research* **1998**, *37*, 99–105.
- (48) Nagy, M.; Grancai, D. Colorimetric Determination of Flavanones in Propolis. *Pharmazie* **1996**, *51*, 100–101.
- (49) Folin, O.; Ciocalteu, V. On Tyrosine and Tryptophan Determination in Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1929**, *73*, 627–650.
- (50) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, 144–158.
- (51) Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins. *Food Chemistry* **2004**, *84*, 329–339.
- (52) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in Enzymology*; Lester Packer, Ed.; Oxidants and Antioxidants Part A; Academic Press, 1999; Vol. 299, pp. 152–178.
- (53) Ikawa, M.; Schaper, T. D.; Dollard, C. A.; Sasner, J. J. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 1811–1815.
- (54) Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M. J. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1370–1373.
- (55) Mammen, D.; Daniel, M. A Critical Evaluation on the Reliability of Two Aluminum Chloride Chelation Methods for Quantification of Flavonoids. *Food Chemistry* **2012**, *135*, 1365–1368.
- (56) Chang, C.-C.; Yang, M.-H.; Wen, H.-M.; Chern, J.-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **2002**, *10*, 178–182.
- (57) Marghitas, L. A.; Dezmirean, D.; Laslo, L.; Moise, A.; Popescu, O.; Maghear, O. VALIDATED METHOD FOR ESTIMATION OF TOTAL FLAVONOIDS IN ROMANIAN PROPOLIS. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies* **2009**, *64*.
- (58) Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Simova, S.; Nikolova, N.; Kujumgiev, A.; Popov, S. Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **1996**, *51*, 277–280.
- (59) Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Miorin, P. L.; da Rocha Pasin, F.; Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2006**, *3*, 249–254.
- (60) Darwish, R. M.; Fares, R. J. A.; Zarga, M. H. A.; Nazer, I. K. Antibacterial Effect of Jordanian Propolis and Isolated Flavonoids against Human Pathogenic Bacteria. *African Journal of Biotechnology* **2013**, *9*, 5966–5974.
- (61) Santos, F. A.; Bastos, E. M. A.; Uzeda, M.; Carvalho, M. A. R.; Farias, L. M.; Moreira, E. S. A.; Braga, F. C. Antibacterial Activity of Brazilian Propolis and Fractions against Oral Anaerobic Bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, *80*, 1–7.
- (62) Pino, J. A.; Marbot, R.; Delgado, A.; Zumárraga, C.; Sauri, E. Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. *Journal of Essential Oil Research* **2006**, *18*, 53–56.
- (63) Pellati, F.; Orlandini, G.; Pinetti, D.; Benvenuti, S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS Methods for Metabolite Profiling of Propolis Extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55*, 934–948.
- (64) Volpi, N. Separation of Flavonoids and Phenolic Acids from Propolis by Capillary Zone Electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1872–1878.
- (65) Chi, H.; Hsieh, A. K.; Ng, C. L.; Lee, H. K.; Li, S. F. Y. Determination of Components in Propolis by Capillary Electrophoresis and Photodiode Array Detection. *Journal of Chromatography A* **1994**, *680*, 593–597.

- (66) Ferreres, F.; Blázquez, M. A.; Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A. Separation of Honey Flavonoids by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1994**, *669*, 268–274.
- (67) Sawaya, A. C. H. F.; Tomazela, D. M.; Cunha, I. B. S.; Bankova, V. S.; Marcucci, M. C.; Custodio, A. R.; Eberlin, M. N. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Propolis. *Analyst* **2004**, *129*, 739–744.
- (68) Pietta, P. G.; Gardana, C.; Pietta, A. M. Analytical Methods for Quality Control of Propolis. *Fitoterapia* **2002**, *73*, Supplement 1, S7–S20.
- (69) Petrova, A.; Popova, M.; Kuzmanova, C.; Tsvetkova, I.; Naydenski, H.; Muli, E.; Bankova, V. New Biologically Active Compounds from Kenyan Propolis. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 509–514.
- (70) Athikomkulchai, S.; Awale, S.; Ruangrunsi, N.; Ruchirawat, S.; Kadota, S. Chemical Constituents of Thai Propolis. *Fitoterapia* **2013**, *88*, 96–100.
- (71) Bertelli, D.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Marazzan, G. L.; Plessi, M. ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochemical Analysis* **2012**, *23*, 260–266.
- (72) Bankova, V. Recent Trends and Important Developments in Propolis Research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2005**, *2*, 29–32.
- (73) Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A.-G. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z. Naturforsch* **2002**, *57c*, 530–533.
- (74) Rubiolo, P.; Casetta, C.; Cagliero, C.; Brevard, H.; Sgorbini, B.; Bicchi, C. *Populus Nigra* L. Bud Absolute: A Case Study for a Strategy of Analysis of Natural Complex Substances. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 1223–1235.
- (75) Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2003**, *51*, 740–742.
- (76) Teixeira, E. W.; Negri, G.; Meira, R. M. S. A.; Message, D.; Salatino, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2005**, *2*, 85–92.
- (77) Salatino, A.; Teixeira, E. W.; Negri, G.; Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2005**, *2*, 33–38.
- (78) Mishima, S.; Inoh, Y.; Narita, Y.; Ohta, S.; Sakamoto, T.; Araki, Y.; Suzuki, K.-M.; Akao, Y.; Nozawa, Y. Identification of Caffeoylquinic Acid Derivatives from Brazilian Propolis as Constituents Involved in Induction of Granulocytic Differentiation of HL-60 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 5814–5818.
- (79) Tomás-Barberán, F. A.; García-Viguera, C.; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. Phytochemical Evidence for the Botanical Origin of Tropical Propolis from Venezuela. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 191–196.
- (80) Hernández, I. M.; Fernandez, M. C.; Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Polyprenylated Benzophenone Derivatives from Cuban Propolis. *Journal of Natural Products* **2005**, *68*, 931–934.
- (81) De Castro Ishida, V. F.; Negri, G.; Salatino, A.; Bandeira, M. F. C. L. A New Type of Brazilian Propolis: Prenylated Benzophenones in Propolis from Amazon and Effects against Cariogenic Bacteria. *Food Chemistry* **2011**, *125*, 966–972.
- (82) Castro, M. L.; Nascimento, A. M. do; Ikegaki, M.; Costa-Neto, C. M.; Alencar, S. M.; Rosalen, P. L. Identification of a Bioactive Compound Isolated from Brazilian Propolis Type 6. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 5332–5335.
- (83) Cuesta-Rubio, O.; Frontana-Urbe, B. A.; Ramírez-Apan, T.; Cárdenas, J. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **2002**, *57*, 372–378.
- (84) De Oliveira, C. M. A.; Porto, A.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A. J. Floral Resins of *Clusia* Spp.: Chemical Composition and Biological Function. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6427–6430.
- (85) Huang, W.-J.; Huang, C.-H.; Wu, C.-L.; Lin, J.-K.; Chen, Y.-W.; Lin, C.-L.; Chuang, S.-E.; Huang, C.-Y.; Chen, C.-N. Propolin G, a Prenylflavanone, Isolated from Taiwanese Propolis, Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Brain Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 7366–7376.
- (86) Kumazawa, S.; Goto, H.; Hamasaka, T.; Fukumoto, S.; Fujimoto, T.; Nakayama, T. A New Prenylated Flavonoid from Propolis Collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2004**, *68*, 260–262.
- (87) Kumazawa, S.; Nakamura, J.; Murase, M.; Miyagawa, M.; Ahn, M.-R.; Fukumoto, S. Plant Origin of Okinawan Propolis: Honeybee Behavior Observation and Phytochemical Analysis. *Die Naturwissenschaften* **2008**, *95*, 781–786.

- (88) El-Bassuony, A. A. New prenylated compound from Egyptian propolis with antimicrobial activity. *Revista Latinoamericana de Quimica* **2009**, *37*, 85–90.
- (89) Matsubayashi, H.; Lagan, P.; Sukor, J. R. A. Utilization of Macaranga Trees by the Asian Elephants (*Elephas Maximus*) in Borneo. *Mammal Study* **2006**, *31*, 115–118.
- (90) Silici, S.; Kutluca, S. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Propolis Collected by Three Different Races of Honeybees in the Same Region. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *99*, 69–73.
- (91) Popova, M. P.; Graikou, K.; Chinou, I.; Bankova, V. S. GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 3167–3176.
- (92) Meagher, L. P.; Beecher, G. R. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **2000**, *13*, 935–947.
- (93) Daugusch, A.; Moraes, C. S.; Fort, P.; Park, Y. K. Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2008**, *5*, 435–441.
- (94) López, B. G.-C.; Schmidt, E. M.; Eberlin, M. N.; Sawaya, A. C. H. F. Phytochemical Markers of Different Types of Red Propolis. *Food Chemistry* **2014**, *146*, 174–180.
- (95) Valcic, S.; Montenegro, G.; Timmermann, B. N. Lignans from Chilean Propolis. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 771–775.
- (96) Meneses, E. A.; Durango, D. L.; García, C. M. Antifungal Activity against Postharvest Fungi by Extracts from Colombian Propolis. *Química Nova* **2009**, *32*, 2011–2017.
- (97) Popova, M.; Bankova, V.; Spassov, S.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Silva, M. V.; Tsartsarova, M. New Bioactive Chalcones in Propolis from El Salvador. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **2001**, *56*, 593–596.
- (98) Christov, R.; Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Bertrand, M. Chemical Composition of Propolis from Canada, Its Antiradical Activity and Plant Origin. *Natural Product Research* **2006**, *20*, 531–536.
- (99) Johnson, K. S.; Eischen, F. A.; Giannasi, D. E. Chemical Composition of North American Bee Propolis and Biological Activity towards Larvae of Greater Wax Moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Chemical Ecology* **1994**, *20*, 1783–1791.
- (100) Bankova, V. S.; Christov, R.; Tejera, A. D. Lignans and Other Constituents of Propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1411–1415.
- (101) Velikova, M.; Bankova, V.; Sorkun, K.; Houcine, S.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Propolis from the Mediterranean Region: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Zeitschrift für Naturforschung* **2000**, *55c*, 790–793.
- (102) Popova, M.; Trusheva, B.; Cutajar, S.; Antonova, D.; Mifsud, D.; Farrugia, C.; Bankova, V. Identification of the Plant Origin of the Botanical Biomarkers of Mediterranean Type Propolis. *Natural Product Communications* **2012**, *7*, 569–570.
- (103) Banskota, A. H.; Nagaoka, T.; Sumioka, L. Y.; Tezuka, Y.; Awale, S.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Antiproliferative Activity of the Netherlands Propolis and Its Active Principles in Cancer Cell Lines. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, *80*, 67–73.
- (104) Shaheen, S. A.; Zarga, M. H. A.; Nazer, I. K.; Darwish, R. M.; Al-Jaber, H. I. Chemical Constituents of Jordanian Propolis. *Natural Product Research* **2011**, *25*, 1312–1318.
- (105) Popova, M.; Dimitrova, R.; Al-Lawati, H. T.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H.; Bankova, V. Omani Propolis: Chemical Profiling, Antibacterial Activity and New Propolis Plant Sources. *Chemistry Central Journal* **2013**, *7*, 158.
- (106) Awale, S.; Shrestha, S. P.; Tezuka, Y.; Ueda, J.; Matsushige, K.; Kadota, S. Neoflavonoids and Related Constituents from Nepalese Propolis and Their Nitric Oxide Production Inhibitory Activity. *Journal of Natural Products* **2005**, *68*, 858–864.
- (107) Shrestha, S. P.; Narukawa, Y.; Takeda, T. Chemical Constituents of Nepalese Propolis II. *Chemical and pharmaceutical Bulletin* **2007**, *55*, 926–929.
- (108) Shrestha, S. P.; Narukawa, Y.; Takeda, T. Chemical Constituents of Nepalese Propolis (II). *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2007**, *55*, 926–929.
- (109) Li, F.; Awale, S.; Zhang, H.; Tezuka, Y.; Esumi, H.; Kadota, S. Chemical Constituents of Propolis from Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against a Human Pancreatic Cancer Cell Line. *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 1283–1287.
- (110) Trusheva, B.; Popova, M.; Koendhori, E. B.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Bankova, V. Indonesian Propolis: Chemical Composition, Biological Activity and Botanical Origin. *Natural Product Research* **2011**, *25*, 606–613.
- (111) Usia, T.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Constituents of Chinese Propolis and Their Antiproliferative Activities. *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 673–676.

- (112) Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Bang, K.-S.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 7286–7292.
- (113) Kumazawa, S.; Suzuki, S.; Ahn, M. R.; Kamihira, M.; Udagawa, Y.; Bang, K. S.; Nakayama, T. A New Chalcone from Propolis Collected on Jeju Island, Korea. *Food Science and Technology Research* **2006**, *12*, 67–69.
- (114) Hamasaka, T.; Kumazawa, S.; Fujimoto, T. F.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan. *Food Science and Technology Research* **10**, 86–92.
- (115) Kumazawa, S.; Fukumoto, S. Macaranga Tanarius, the Plant Origin of Okinawan Propolis. *Mitsubachi Kagaku* **2010**, *28*, 1–6.
- (116) Popravko, S. A.; Sokolov, M. V. Plant sources of propolis. *Pchelovodstvo* **1980**, 28–29.
- (117) Missima, F.; Filho, A. A. da S.; Nunes, G. A.; Bueno, P. C. P.; De Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; Sforcin, J. M. Effect of Baccharis Dracunculifolia D.C (Asteraceae) Extracts and Its Isolated Compounds on Macrophage Activation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2007**, *59*, 463–468.
- (118) Tazawa, S.; Warashina, T.; Noro, T. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis II. *Chemical and pharmaceutical Bulletin* **1999**, *47*, 1388–1392.
- (119) Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 896–900.
- (120) Trusheva, B.; Popova, M.; Naydenski, H.; Tsvetkova, I.; Rodriguez, J. G.; Bankova, V. New Polyisoprenylated Benzophenones from Venezuelan Propolis. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 683–689.
- (121) Awale, S.; Li, F.; Onozuka, H.; Esumi, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Constituents of Brazilian Red Propolis and Their Preferential Cytotoxic Activity against Human Pancreatic PANC-1 Cancer Cell Line in Nutrient-Deprived Condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 181–189.
- (122) Bankova, V. Chemical Diversity of Propolis and the Problem of Standardization. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *100*, 114–117.
- (123) Popova, M. P.; Bankova, V. S.; Bogdanov, S.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Marcazzan, G. L.; Sabatini, A.-G. Chemical Characteristics of Poplar Type Propolis of Different Geographic Origin. *Apidologie* **2007**, *38*, 306–311.
- (124) Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* **2009**, *4*, 25–39.
- (125) Gregoris, E.; Stevanato, R. Correlations between Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Venetian Propolis. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 76–82.
- (126) Rodríguez, Y.; Sánchez-Catalán, F.; Rojano, B.; Durango, D.; Gil, J.; Marín-Loaiza, J. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del atlántico, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* **2012**, *15*, 303–311.
- (127) Silva, V.; Genta, G.; Möller, M. N.; Masner, M.; Thomson, L.; Romero, N.; Radi, R.; Fernandes, D. C.; Laurindo, F. R. M.; Heinzen, H.; Fierro, W.; Denicola, A. Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In *Vitro and Cellular Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 6430–6437.
- (128) Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. Antioxidant Activity of Propolis: Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Galangin. *Fitoterapia* **2002**, *73*, Supplement 1, S21–S29.
- (129) Özcan, M. Inhibition of Aspergillus Parasiticus NRRL 2999 by Pollen and Propolis Extracts. *Journal of Medicinal Food* **2004**, *7*, 114–116.
- (130) Netíková, L.; Bogusch, P.; Heneberg, P. Czech Ethanol-Free Propolis Extract Displays Inhibitory Activity against a Broad Spectrum of Bacterial and Fungal Pathogens. *Journal of Food Science* **2013**, *78*, M1421–M1429.
- (131) Siqueira, A. b. s.; Gomes, B. s.; Cambuim, I.; Maia, R.; Abreu, S.; Souza-Motta, C. m.; De Queiroz, L. a.; Porto, A. I. f. Trichophyton Species Susceptibility to Green and Red Propolis from Brazil. *Letters in Applied Microbiology* **2009**, *48*, 90–96.
- (132) Koç, N. A.; Silici, S. Comparative Study Ofin Vitro Methods Used to Analyse the Antifungal Activity of Propolis againstTrichophyton Rubrum andTrichophyton Mentagrophytes. *Annals of Microbiology* **2008**, *58*, 543–547.
- (133) Murad, J. M.; Calvi, S. A.; Soares, A. M. V. C.; Bankova, V.; Sforcin, J. M. Effects of Propolis from Brazil and Bulgaria on Fungicidal Activity of Macrophages against Paracoccidioides Brasiliensis. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, *79*, 331–334.
- (134) Lu, L.-C.; Chen, Y.-W.; Chou, C.-C. Antibacterial Activity of Propolis against Staphylococcus Aureus. *International Journal of Food Microbiology* **2005**, *102*, 213–220.
- (135) Koo, H.; Gomes, B. P. F. A.; Rosalen, P. L.; Ambrosano, G. M. B.; Park, Y. K.; Cury, J. A. In Vitro Antimicrobial Activity of Propolis and Arnica Montana against Oral Pathogens. *Archives of Oral Biology* **2000**, *45*, 141–148.

- (136) Joëlle Millet; Marie-Claude Martini; Monique Seiller. Chapitre 18: Matières premières produites par l'abeille. 2- La propolis. In *Actifs et additifs en cosmétologie (3^e Éd.)*; Lavoisier, 2006; pp. 338–350.
- (137) Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Dantas, A. P.; Valente, P. H. M.; Paulino, N. Phenolic Compounds from Brazilian Propolis with Pharmacological Activities. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, *74*, 105–112.
- (138) Yang, H.-Y.; Chang, C.-M.; Chen, Y.-W.; Chou, C.-C. Inhibitory Effect of Propolis Extract on the Growth of *Listeria Monocytogenes* and the Mutagenicity of 4-Nitroquinoline-N-Oxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, *86*, 937–943.
- (139) Boyanova, L.; Gergova, G.; Nikolov, R.; Derejian, S.; Lazarova, E.; Katsarov, N.; Mitov, I.; Krastev, Z. Activity of Bulgarian Propolis against 94 *Helicobacter Pylori* Strains in Vitro by Agar-Well Diffusion, Agar Dilution and Disc Diffusion Methods. *Journal of medical microbiology* **2005**, *54*, 481–483.
- (140) Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana, I. K.; Ishii, E.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Hepatoprotective and Anti-*Helicobacter Pylori* Activities of Constituents from Brazilian Propolis. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 16–23.
- (141) Santos, V. R.; Gomes, R. T.; Mesquita, R. A. de; Moura, M. D. G. de; França, E. C.; Aguiar, E. G. de; Naves, M. D.; Abreu, J. A. S.; Abreu, S. R. L. Efficacy of Brazilian Propolis Gel for the Management of Denture Stomatitis: A Pilot Study. *Phytotherapy Research* **2008**, *22*, 1544–1547.
- (142) Sforcin, J. M.; Bankova, V. Propolis: Is There a Potential for the Development of New Drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *133*, 253–260.
- (143) Fernandes Júnior, A.; Balestrin, E. C.; Betoni, J. E. C.; Orsi, R. de O.; Cunha, M. de L. R. de S. da; Montelli, A. C. Propolis: Anti-Staphylococcus Aureus Activity and Synergism with Antimicrobial Drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 563–566.
- (144) Stepanović, S.; Antić, N.; Dakić, I.; Švabić-Vlahović, M. In Vitro Antimicrobial Activity of Propolis and Synergism between Propolis and Antimicrobial Drugs. *Microbiological Research* **2003**, *158*, 353–357.
- (145) Schnitzler, P.; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack, H.; Sensch, K. H.; Reichling, J. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research* **2010**, *24*, S20–S28.
- (146) Liu, A.-L.; Wang, H.-D.; Lee, S. M.; Wang, Y.-T.; Du, G.-H. Structure–activity Relationship of Flavonoids as Influenza Virus Neuraminidase Inhibitors and Their in Vitro Anti-Viral Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 7141–7147.
- (147) Burke, T. R. J.; Fesen, M.; Mazumder, A.; Yung, J.; Wang, J.; Carothers, A. M.; Grunberger, D.; Driscoll, J.; Pommier, Y.; Kohn, K. Hydroxylated Aromatic Inhibitors of HIV-1 Integrase. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 4171–4178.
- (148) Gekker, G.; Hu, S.; Spivak, M.; Lokensgard, J. R.; Peterson, P. K. Anti-HIV-1 Activity of Propolis in CD4+ Lymphocyte and Microglial Cell Cultures. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *102*, 158–163.
- (149) Rossi, A.; Ligresti, A.; Longo, R.; Russo, A.; Borrelli, F.; Sautebin, L. The Inhibitory Effect of Propolis and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cyclooxygenase Activity in J774 Macrophages. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 530–535.
- (150) Orsatti, C. L.; Missima, F.; Pagliarone, A. C.; Sforcin, J. M. Th1/Th2 Cytokines' Expression and Production by Propolis-Treated Mice. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *129*, 314–318.
- (151) Park, J. H.; Lee, J. K.; Kim, H. S.; Chung, S. T.; Eom, J. H.; Kim, K. A.; Chung, S. J.; Paik, S. Y.; Oh, H. Y. Immunomodulatory Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Balb/c Mice. *International Immunopharmacology* **2004**, *4*, 429–436.
- (152) Orsi, R. O.; Funari, S. R. C.; Soares, A. M. V. C.; Calvi, S. A.; Oliveira, S. L.; Sforcin, J. M.; Bankova, V. Immunomodulatory Action of Propolis on Macrophage Activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins* **2000**, *6*, 205–219.
- (153) Sforcin, J. M. Propolis and the Immune System: A Review. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *113*, 1–14.
- (154) Chirumbolo, S. Propolis as Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Compounds: Which Role for Flavonoids? *International Immunopharmacology* **2011**, *11*, 1386–1387.
- (155) Khayyal, M. T.; El-Ghazaly, M. A.; El-Khatib, A. S.; Hatem, A. M.; De Vries, P. J. F.; El-Shafei, S.; Khattab, M. M. A Clinical Pharmacological Study of the Potential Beneficial Effects of a Propolis Food Product as an Adjuvant in Asthmatic Patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2003**, *17*, 93–102.
- (156) Sawicka, D.; Car, H.; Borawska, M. H.; Nikliński, J. The Anticancer Activity of Propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **2012**, *50*, 25–37.
- (157) Watanabe, M. A. E.; Amarante, M. K.; Conti, B. J.; Sforcin, J. M. Cytotoxic Constituents of Propolis Inducing Anticancer Effects: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *63*, 1378–1386.

- (158) Valente, M. J.; Baltazar, A. F.; Henrique, R.; Estevinho, L.; Carvalho, M. Biological Activities of Portuguese Propolis: Protection against Free Radical-Induced Erythrocyte Damage and Inhibition of Human Renal Cancer Cell Growth in Vitro. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 86–92.
- (159) Sha, N.; Guan, S.-H.; Lu, Z.-Q.; Chen, G.-T.; Huang, H.-L.; Xie, F.-B.; Yue, Q.-X.; Liu, X.; Guo, D.-A. Cytotoxic Constituents of Chinese Propolis. *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 799–801.
- (160) Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Cytotoxic Constituents from Brazilian Red Propolis and Their Structure–activity Relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 5434–5440.
- (161) Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Melliou, E.; Chinou, I. Antiproliferative Activity of Greek Propolis. *Journal of Medicinal Food* **2010**, *13*, 286–290.
- (162) Najafi, M. F.; Vahedy, F.; Seyyedini, M.; Jomehzadeh, H. R.; Bozary, K. Effect of the Water Extracts of Propolis on Stimulation and Inhibition of Different Cells. *Cytotechnology* **2007**, *54*, 49–56.
- (163) Hernandez, J.; Goycoolea, F.; Quintero, J.; Acosta, A.; Castañeda, M.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Vazquez-Moreno, L.; Velazquez, E.; Astiazaran, H.; Lugo, E.; Velazquez, C. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica* **2007**, *73*, 1469–1474.
- (164) Lee, K. W.; Kang, N. J.; Kim, J. H.; Lee, K. M.; Lee, D. E.; Hur, H. J.; Lee, H. J. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Invasion and Expression of Matrix Metalloproteinase in SK-Hep1 Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting Nuclear Factor Kappa B. *Genes & Nutrition* **2008**, *2*, 319–322.
- (165) Lee, K. J.; Choi, J. H.; Hwang, Y. P.; Chung, Y. C.; Jeong, H. G. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Hepatotoxicity and DNA Damage. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 2445–2450.
- (166) Jin, U.-H.; Song, K.-H.; Motomura, M.; Suzuki, I.; Gu, Y.-H.; Kang, Y.-J.; Moon, T.-C.; Kim, C.-H. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Myeloid Leukemia U937 Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2008**, *310*, 43–48.
- (167) Jung, B.; Kim, M.; Kim, H.-A.; Kim, D.; Yang, J.; Her, S.; Song, Y. S. Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Component of Beehive Propolis, Is a Novel Selective Estrogen Receptor Modulator. *Phytotherapy Research* **2010**, *24*, 295–300.
- (168) Lin, W.-L.; Liang, W.-H.; Lee, Y.-J.; Chuang, S.-K.; Tseng, T.-H. Antitumor Progression Potential of Caffeic Acid Phenethyl Ester Involving p75NTR in C6 Glioma Cells. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *188*, 607–615.
- (169) Lin, H.-P.; Lin, C.-Y.; Liu, C.-C.; Su, L.-C.; Huo, C.; Kuo, Y.-Y.; Tseng, J.-C.; Hsu, J.-M.; Chen, C.-K.; Chuu, C.-P. Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Potential Treatment for Advanced Prostate Cancer Targeting Akt Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*, 5264–5283.
- (170) Oztürk, F.; Kurt, E.; Inan, U. U.; Emiroğlu, L.; Ilker, S. S. The Effects of Acetylcholine and Propolis Extract on Corneal Epithelial Wound Healing in Rats. *Cornea* **1999**, *18*, 466–471.
- (171) De Barros, M. P.; Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; de Andrade, S. F. Effect of Brazilian Green Propolis on Experimental Gastric Ulcers in Rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *110*, 567–571.
- (172) Lemos, M.; De Barros, M. P.; Sousa, J. P. B.; Filho, A. A. da S.; Bastos, J. K.; De Andrade, S. F. Baccharis Dracunculifolia, the Main Botanical Source of Brazilian Green Propolis, Displays Antiulcer Activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2007**, *59*, 603–608.
- (173) Pontin, K.; Filho, A. A. D. S.; Santos, F. F.; Silva, M. L. A. e; Cunha, W. R.; Nanayakkara, N. P. D.; Bastos, J. K.; Albuquerque, S. de. In Vitro and in Vivo Antileishmanial Activities of a Brazilian Green Propolis Extract. *Parasitology Research* **2008**, *103*, 487–492.
- (174) Jasprica, I.; Mornar, A.; Debeljak, Ž.; Smolčić-Bubalo, A.; Medić-Šarić, M.; Mayer, L.; Romić, Ž.; Bućan, K.; Balog, T.; Sobočanec, S.; Šverko, V. In Vivo Study of Propolis Supplementation Effects on Antioxidative Status and Red Blood Cells. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *110*, 548–554.
- (175) Burdock, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* **1998**, *36*, 347–363.
- (176) Gardana, C.; Simonetti, P. Evaluation of Allergens in Propolis by Ultra-Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25*, 1675–1682.
- (177) Boudet, A. N.; Cornard, J. P.; Merlin, J. C. UV-visible Investigation of the Aluminum (III) Complexes of 3-hydroxy-, 5-hydroxy- and 3',4'-dihydroxy-flavone. In: Greve, Jan; Puppels, Gerwin J.; Otto, Cees: Enschede, Netherlands, 1999; pp. 551–552.
- (178) Porter, L. J.; Markham, K. R. Aluminium Complexes of Flavanones and Dihydroflavonols. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1477–1478.
- (179) González, A. G.; Aguiar, Z. E.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; Vázquez, J. T.; Domínguez, X. A. Flavonoids from Salvia Texana. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2871–2872.
- (180) Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of NMR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc.; Milwaukee, WI, 1983; Vol. 2, p182.

- (181) Wagner, H.; Chari, V. M.; Sonnenbichler, J. ¹³C-NMR-Spektren Natürlich Vorkommender Flavonoide. *Tetrahedron Letters* **1976**, *17*, 1799–1802.
- (182) Fang, J.-M.; Su, W.-C.; Cheng, Y.-S. Flavonoids and Stilbenes from Armand Pine. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1395–1397.
- (183) HORTON, W. J.; ROBERTSON, D. E. Ultraviolet Spectra of Substituted Acetophenones and Benzoic Acids. *The Journal of Organic Chemistry* **1960**, *25*, 1016–1020.
- (184) Lang, L. *Absorption Spectra in the Ultraviolet and Visible Region*; Academic Press.; New York, 1961.
- (185) Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Wilkins, A. L.; Daldy, J. A.; Lu, Y. HPLC and GC-MS Identification of the Major Organic Constituents in New Zealand Propolis. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 205–211.
- (186) Bankova, V. S. Synthesis of Natural Esters of Substituted Cinnamic Acids. *Journal of Natural Products* **1990**, *53*, 821–824.
- (187) Afolayan, A. J.; Meyer, J. J. M. The Antimicrobial Activity of 3,5,7-Trihydroxyflavone Isolated from the Shoots of Helichrysum Aureonitens. *Journal of Ethnopharmacology* **1997**, *57*, 177–181.
- (188) Mazille, F.; Schoettl, T.; Lopez, A.; Pulgarin, C. Physico-Chemical Properties and Photo-Reactivity Relationship for Para-Substituted Phenols in Photo-Assisted Fenton System. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *210*, 193–199.
- (189) Greenaway, W.; May, J.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R. Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of 150 Compounds in Propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **1991**, *46*, 111–121.
- (190) Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R. Composition of Propolis in Oxfordshire, U.K. and Its Relation to Poplar Bud Exudate. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **1988**, *43*, 301–304.
- (191) Falcão, S. I.; Vale, N.; Gomes, P.; Domingues, M. R. M.; Freire, C.; Cardoso, S. M.; Vilas-Boas, M. Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis* **2013**, *24*, 309–318.
- (192) Sanyal, R.; Badami, B. V. A New Synthesis of 3-Arylpropenoic Acids and 5-Phenyl-2,4-Pentadienoic Acid from 4-Acetyl-3-Arylsydnone and Arylaldehydes. *Organic Communications* **2009**, *2*, 42–48.
- (193) Popravko, S. A.; Gurevich, A. I.; Kolosov, M. N. Flavonoid Components of Propolis. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* **1969**, *5*, 472–482.
- (194) Yamauchi, R.; Kato, K.; Oida, S.; Kanaeda, J.; Ueno, Y. Benzyl Caffeate, an Antioxidative Compound Isolated from Propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1992**, *56*, 1321–1322.
- (195) Park, Y.; Moon, B.-H.; Yang, H.; Lee, Y.; Lee, E.; Lim, Y. Complete Assignments of NMR Data of 13 Hydroxymethoxyflavones. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2007**, *45*, 1072–1075.
- (196) Gripenberg, J.; Honkanen, E.; Silander, K.; Stenhagen, E.; Thorell, B. The Structure of Alpinone. *Acta Chemica Scandinavica* **1956**, *10*, 393–396.
- (197) Sova, M.; Perdiš, A.; Kotnik, M.; Kristan, K.; Rižner, T. L.; Solmajer, T.; Gobec, S. Flavonoids and Cinnamic Acid Esters as Inhibitors of Fungal 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase: A Synthesis, QSAR and Modelling Study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 7404–7418.
- (198) Correia, R.; DeShong, P. Palladium-Catalyzed Arylation of Allylic Benzoates Using Hypervalent Siloxane Derivatives†. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 7159–7165.
- (199) Jang, D. S.; Cuendet, M.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. Constituents of Asparagus Officinalis Evaluated for Inhibitory Activity against Cyclooxygenase-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 2218–2222.
- (200) Koshino, H.; Terada, S.-I.; Yoshihara, T.; Sakamura, S.; Shimanuki, T.; Sato, T.; Tajimi, A. Three Phenolic Acid Derivatives from Stromata of Epichloe Typhina on Phleum Pratense. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1333–1338.
- (201) Cooper, R.; Gottlieb, H. E.; Lavie, D. New Phenolic Diglycerides from Aegilops Ovata. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1673–1675.
- (202) Valencia, D.; Alday, E.; Robles-Zepeda, R.; Garibay-Escobar, A.; Galvez-Ruiz, J. C.; Salas-Reyes, M.; Jiménez-Estrada, M.; Velazquez-Contreras, E.; Hernandez, J.; Velazquez, C. Seasonal Effect on Chemical Composition and Biological Activities of Sonoran Propolis. *Food Chemistry* **2012**, *131*, 645–651.
- (203) Almela, L.; Sánchez-Muñoz, B.; Fernández-López, J. A.; Roca, M. J.; Rabe, V. Liquid Chromatographic-mass Spectrometric Analysis of Phenolics and Free Radical Scavenging Activity of Rosemary Extract from Different Raw Material. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1120*, 221–229.
- (204) Buratti, S.; Benedetti, S.; Cosio, M. S. Evaluation of the Antioxidant Power of Honey, Propolis and Royal Jelly by Amperometric Flow Injection Analysis. *Talanta* **2007**, *71*, 1387–1392.

- (205) Teixeira, E. W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A.; Stringheta, P. C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2010**, *7*, 307–315.
- (206) Dangles, O. Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16*, 692–714.
- (207) Kawashima, T.; Manda, S.; Uto, Y.; Ohkubo, K.; Hori, H.; Matsumoto, K.; Fukuhara, K.; Ikota, N.; Fukuzumi, S.; Ozawa, T.; Anzai, K.; Nakanishi, I. Kinetics and Mechanism for the Scavenging Reaction of the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical by Synthetic Artepillin C Analogues. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2012**, *85*, 877–883.
- (208) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, *20*, 933–956.
- (209) Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352.
- (210) Patil, C. B.; Mahajan, S. K.; Katti, S. A. Chalcone: A Versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2009**, *1*, 11–22.
- (211) Takeuchi, M.; Yamagishi, S. Possible Involvement of Advanced Glycation End-Products (AGEs) in the Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 973–978.
- (212) Ahmed, N. Advanced Glycation Endproducts—role in Pathology of Diabetic Complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2005**, *67*, 3–21.
- (213) Jandeleit-Dahm, K.; Cooper, M. E. The Role of AGEs in Cardiovascular Disease. *Current pharmaceutical design* **2008**, *14*, 979–986.
- (214) Miyata, T.; Iida, Y.; Horie, K.; Cai, Z.; Sugiyama, S.; Maeda, K. Pathophysiology of Advanced Glycation End-Products in Renal Failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* **1996**, *11*, 27–30.
- (215) Gillery, P. Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré. *Annales de Biologie Clinique* **2006**, *64*, 309–314.
- (216) Sero, L.; Calard, F.; Sanguinet, L.; Levillain, E.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Derbre, S. Synthesis and Evaluation of Naphthoic Acid Derivatives as Fluorescent Probes to Screen Advanced Glycation End-Products Breakers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 6716–6720.
- (217) Yoo, N. H.; Jang, D. S.; Yoo, J. L.; Lee, Y. M.; Kim, Y. S.; Cho, J.-H.; Kim, J. S. Erigeronflavanone, a Flavanone Derivative from the Flowers of *Erigeron Annuus* with Protein Glycation and Aldose Reductase Inhibitory Activity. *Journal of Natural Products* **2008**, *71*, 713–715.
- (218) Derbré, S.; Gatto, J.; Pelleray, A.; Coulon, L.; Séraphin, D.; Richomme, P. Automating a 96-Well Microtiter Plate Assay for Identification of AGEs Inhibitors or Inducers: Application to the Screening of a Small Natural Compounds Library. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 1747–1758.
- (219) Séro, L.; Sanguinet, L.; Blanchard, P.; Dang, B. T.; Morel, S.; Richomme, P.; Séraphin, D.; Derbré, S. Tuning a 96-Well Microtiter Plate Fluorescence-Based Assay to Identify AGE Inhibitors in Crude Plant Extracts. *Molecules* **2013**, *18*, 14320–14339.
- (220) Vinson, J. A.; Howard III, T. B. Inhibition of Protein Glycation and Advanced Glycation End Products by Ascorbic Acid and Other Vitamins and Nutrients. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **1996**, *7*, 659–663.
- (221) Bruneton, J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*; Éd. Tec & doc; Éd. médicales internationales: Paris; Cachan, 2009.
- (222) Thornalley, P. J. Use of Aminoguanidine (Pimagedine) to Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Archives of biochemistry and biophysics* **2003**, *419*, 31–40.
- (223) Lou, H.; Yuan, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Oka, S. Alkaloids and Flavonoids from Peanut Skins. *Planta Medica* **2001**, *67*, 345–349.
- (224) Nakagawa, T.; Yokozawa, T.; Terasawa, K.; Shu, S.; Juneja, L. R. Protective Activity of Green Tea against Free Radical- and Glucose-Mediated Protein Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 2418–2422.
- (225) Matsuda, H.; Wang, T.; Managi, H.; Yoshikawa, M. Structural Requirements of Flavonoids for Inhibition of Protein Glycation and Radical Scavenging Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 5317–5323.
- (226) Porfírio, D. A.; Ferreira, R. de Q.; Malagutti, A. R.; Valle, E. M. A. Electrochemical Study of the Increased Antioxidant Capacity of Flavonoids through Complexation with iron(II) Ions. *Electrochimica Acta* **2014**, *141*, 33–38.
- (227) Říha, M.; Karlíčková, J.; Filipský, T.; Macáková, K.; Rocha, L.; Bovicelli, P.; Silvestri, I. P.; Saso, L.; Jahodář, L.; Hrdina, R.; Mladěnka, P. In Vitro Evaluation of Copper-Chelating Properties of Flavonoids. *RSC Advances* **2014**, *4*, 32628.

- (228) Fan, G.-J.; Jin, X.-L.; Qian, Y.-P.; Wang, Q.; Yang, R.-T.; Dai, F.; Tang, J.-J.; Shang, Y.-J.; Cheng, L.-X.; Yang, J.; Zhou, B. Hydroxycinnamic Acids as DNA-Cleaving Agents in the Presence of Cull Ions: Mechanism, Structure–Activity Relationship, and Biological Implications. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15*, 12889–12899.
- (229) Lo, C.-Y.; Li, S.; Tan, D.; Pan, M.-H.; Sang, S.; Ho, C.-T. Trapping Reactions of Reactive Carbonyl Species with Tea Polyphenols in Simulated Physiological Conditions. *Molecular Nutrition & Food Research* **2006**, *50*, 1118–1128.
- (230) Sang, S.; Shao, X.; Bai, N.; Lo, C.-Y.; Yang, C. S.; Ho, C.-T. Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate: A New Trapping Agent of Reactive Dicarbonyl Species. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *20*, 1862–1870.
- (231) Tsimidou, M. Z.; Nenadis, N.; Zhang HongYu. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Natural Antioxidant Phenols* **2006**, 29–67.
- (232) Peng, X.; Cheng, K.-W.; Ma, J.; Chen, B.; Ho, C.-T.; Lo, C.; Chen, F.; Wang, M. Cinnamon Bark Proanthocyanidins as Reactive Carbonyl Scavengers To Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 1907–1911.
- (233) Liu, R.; Wu, C.; Zhou, D.; Yang, F.; Tian, S.; Zhang, L.; Zhang, T.; Du, G. Pinocembrin Protects against B-Amyloid-Induced Toxicity in Neurons through Inhibiting Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-Independent Signaling Pathways and Regulating Mitochondrion-Mediated Apoptosis. *BMC Medicine* **2012**, *10*, 105.
- (234) Boisard, S.; Le Ray, A.-M.; Gatto, J.; Aumond, M.-C.; Blanchard, P.; Derbré, S.; Flurin, C.; Richomme, P. Chemical Composition, Antioxidant and Anti-AGEs Activities of a French Poplar Type Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 1344–1351.
- (235) Fidel, P. L.; Vazquez, J. A.; Sobel, J. D. Candida Glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. Albicans. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 80–96.
- (236) Latgé, J.-P. Aspergillus Fumigatus and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 310–350.
- (237) Bosio, K.; Avanzini, C.; D'avolio, A.; Ozino, O.; Savoia, D. In Vitro Activity of Propolis against Streptococcus Pyogenes. *Letters in Applied Microbiology* **2000**, *31*, 174–177.
- (238) Agüero, M. B.; Svetaz, L.; Sánchez, M.; Luna, L.; Lima, B.; López, M. L.; Zacchino, S.; Palermo, J.; Wunderlin, D.; Feresin, G. E.; Tapia, A. Argentinean Andean Propolis Associated with the Medicinal Plant Larrea Nitida Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS Characterization and Antifungal Activity. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 1970–1978.
- (239) Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2013**, *11*, 297–308.
- (240) Watkins, D. A.; Chahine, A.; Creger, R. J.; Jacobs, M. R.; Lazarus, H. M. Corynebacterium Striatum: A Diphtheroid with Pathogenic Potential. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **1993**, *17*, 21–25.
- (241) Ríos, J. L.; Recio, M. C. Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *100*, 80–84.
- (242) Bonvehí, J. S.; Coll, F. V.; Jordà, R. E. The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1994**, *71*, 529–532.
- (243) Grange, J. M.; Davey, R. W. Antibacterial Properties of Propolis (bee Glue). *Journal of the Royal Society of Medicine* **1990**, *83*, 159–160.
- (244) Kujumgiev, A.; Bankova, V.; Ignatova, A.; Popov, S. Antibacterial Activity of Propolis, Some of Its Components and Their Analogs. *Die Pharmazie* **1993**, *48*, 785–786.
- (245) Krol, W.; Scheller, S.; Shani, J.; Pietsz, G.; Czuba, Z. Synergistic Effect of Ethanolic Extract of Propolis and Antibiotics on the Growth of Staphylococcus Aureus. *Arzneimittel-Forschung* **1993**, *43*, 607–609.
- (246) Mirzoeva, O. K.; Grishanin, R. N.; Calder, P. C. Antimicrobial Action of Propolis and Some of Its Components: The Effects on Growth, Membrane Potential and Motility of Bacteria. *Microbiological Research* **1997**, *152*, 239–246.
- (247) AL-Waili, N. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *International Journal of Medical Sciences* **2012**, *9*, 793–800.
- (248) Wojtyczka, R. D.; Dzedzic, A.; Idzik, D.; Kępa, M.; Kubina, R.; Kabała-Dzik, A.; Smoleń-Dzirba, J.; Stojko, J.; Sajewicz, M.; Wąsik, T. J. Susceptibility of Staphylococcus Aureus Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Molecules* **2013**, *18*, 9623–9640.
- (249) Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2010**, *74*, 417–433.
- (250) Liu, B.; Pop, M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, D443–D447.

- (251) Theuretzbacher, U. Accelerating Resistance, Inadequate Antibacterial Drug Pipelines and International Responses. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2012**, *39*, 295–299.
- (252) Abdel-Lateff, A.; König, G. M.; Fisch, K. M.; Höller, U.; Jones, P. G.; Wright, A. D. New Antioxidant Hydroquinone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Acremonium* Sp. *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 1605–1611.
- (253) Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Prior, R. L. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 4437–4444.
- (254) Alomar, K.; Gaumet, V.; Allain, M.; Bouet, G.; Landreau, A. Synthesis, Crystal Structure, Characterisation, and Antifungal Activity of 3-Thiophene Aldehyde Semicarbazone (3STCH), 2,3-Thiophene Dicarboxaldehyde Bis(semicarbazone) (2,3BSTCH₂) and Their Nickel (II) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *115*, 36–43.
- (255) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard M27-A, Villanova, PA, 1997.
- (256) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard, NCCLS Document M38-A., Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, 2002.
- (257) Alomar, K.; Landreau, A.; Kempf, M.; Khan, M. A.; Allain, M.; Bouet, G. Synthesis, Crystal Structure, Characterization of zinc(II), cadmium(II) Complexes with 3-Thiophene Aldehyde Thiosemicarbazone (3TTSCH). Biological Activities of 3TTSCH and Its Complexes. *Journal of inorganic biochemistry* **2010**, *104*, 397–404.
- (258) Matos, V. R.; Alencar, S. M.; Santos, F. A. R. Pollen Types and Levels of Total Phenolic Compounds in Propolis Produced by *Apis Mellifera* L. (Apidae) in an Area of the Semiarid Region of Bahia, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2014**, *86*, 407–418.
- (259) Barth, O. M.; Fernandes Pinto da Luz, C. Palynological Analysis of Brazilian Red Propolis Samples. *Journal of Apicultural Research* **2009**, *48*, 181–188.
- (260) Barrientos, L.; Herrera, C. L.; Montenegro, G.; Ortega, X.; Veloz, J.; Alvear, M.; Cuevas, A.; Saavedra, N.; Salazar, L. A. Chemical and Botanical Characterization of Chilean Propolis and Biological Activity on Cariogenic Bacteria *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Sobrinus*. *Brazilian Journal of Microbiology* **2013**, *44*, 577–585.
- (261) Goupy, J. *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*; Technique et ingénierie; Dunod, 1999.
- (262) King, J. W.; Grabiell, R. D. Isolation of Polyphenolic Compounds from Fruits or Vegetables Utilizing Sub-Critical Water Extraction. 7208181, 2007.
- (263) Lekar, A. V.; Borisenko, S. N.; Filonova, O. V.; Vetrova, E. V.; Sushkova, S. N.; Borisenko, N. I. Subcritical Water Extraction of Quercetin from *Polygonum Hydropiper* L. *Middle-East Journal of Scientific Research* **2013**, *17*, 252–255.
- (264) Ibañez, E.; Kubátová, A.; Señoráns, F. J.; Cavero, S.; Reglero, G.; Hawthorne, S. B. Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 375–382.
- (265) Celhay, C. Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante: procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi- vis et étude des conditions subcritiques <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00002304/> 2013.
- (266) Luque de Castro, M. D.; Jiménez-Carmona, M. M.; Fernández-Pérez, V. Towards More Rational Techniques for the Isolation of Valuable Essential Oils from Plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1999**, *18*, 708–716.
- (267) Haar, L.; Gallagher, J. S.; Kell, G. S. *NBS/NRC Steam Tables: Thermodynamic and Transport Properties and Computer Programs for Vapor and Liquid States of Water in SI Units*; Taylor & Francis: Bristol, Royaume-Uni, 1984.
- (268) Miller, D. J.; Hawthorne, S. B. Solubility of Liquid Organic Flavor and Fragrance Compounds in Subcritical (Hot/Liquid) Water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2000**, *45*, 315–318.
- (269) Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-by-Products, Algae and Microalgae: A Review. *Food Chemistry* **2006**, *98*, 136–148.
- (270) Rodríguez-Meizoso, I.; Marin, F. R.; Herrero, M.; Señoráns, F. J.; Reglero, G.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. Subcritical Water Extraction of Nutraceuticals with Antioxidant Activity from Oregano. Chemical and Functional Characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41*, 1560–1565.

- (271) Shimanouchi, T.; Ueno, S.; Yang, W.; Kimura, Y. Extraction of Reducing Sugar with Anti-Oxidative Scavengers from Peels of *Carya Cathayensis* Sarg.: Use of Subcritical Water. *Environmental Engineering Research* **2014**, *19*, 41–45.
- (272) Yoswathana, N.; Eshtiaghi, M. N. Optimization for Subcritical Water Extraction of Phenolic Compounds from Rambutan Peels. *World Academy of Sciences, Engineering and Technology* **2013**, *7*, 121–126.
- (273) Lotti, C.; Campo Fernandez, M.; Piccinelli, A. L.; Cuesta-Rubio, O.; Márquez Hernández, I.; Rastrelli, L. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 2209–2213.
- (274) Tolosa, L.; Canizares, E. The Collection, Characterisation and Evaluation of Antimicrobial of Propolis Extracts from Campeche, Mexico. *Ars Pharmaceutica* **2002**, *43*, 187–204.
- (275) Londono Orozco, A.; Avila Acevedo, J. G.; Canales Martinez, M. M.; Hernandez Delgado, C. T.; Serrano, P. R.; Flores Ortiz, C. M.; Diaz, A. D.; Penieres Carrillo, J. G.; Garcia Tovar, C. G.; Cruz Sanchez, T. A. Antibacterial Comparative Study Between Extracts of Mexican Propolis and of Three Plants Which Use *Apis Mellifera* for Its Production. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **2010**, *9*, 1250–1254.
- (276) Almutairi, S.; Eapen, B.; Chundi, S. M.; Akhalil, A.; Siheri, W.; Clements, C.; Fearnley, J.; Watson, D. G.; Edrada-Ebel, R. New Anti-Trypanosomal Active Prenylated Compounds from African Propolis. *Phytochemistry Letters* **2014**, *10*, 35–39.
- (277) Kardar, M. N.; Zhang, T.; Coxon, G. D.; Watson, D. G.; Fearnley, J.; Seidel, V. Characterisation of Triterpenes and New Phenolic Lipids in Cameroonian Propolis. *Phytochemistry* **2014**, *106*, 156–163.
- (278) Zhang, T.; Omar, R.; Siheri, W.; Al Mutairi, S.; Clements, C.; Fearnley, J.; Edrada-Ebel, R.; Watson, D. Chromatographic Analysis with Different Detectors in the Chemical Characterisation and Dereplication of African Propolis. *Talanta* **2014**, *120*, 181–190.
- (279) Haile, K.; Dekebo, A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Haramaya Propolis (bee Glue), Ethiopia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2013**, *4*, 734–740.
- (280) Furukawa, S.; Takagi, N.; Ikeda, T.; Ono, M.; Nafady, A. M.; Nohara, T.; Sugimoto, H.; Doi, S.; Yamada, H. Two Novel Long-Chain Alkanoic Acid Esters of Lupeol from Alecrim-Propolis. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2002**, *50*, 439–440.
- (281) Ito, J.; Chang, F.-R.; Wang, H.-K.; Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K.-H. Anti-AIDS Agents. 48.1 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *Journal of Natural Products* **2001**, *64*, 1278–1281.
- (282) Negri, G.; Salatino, M. L. F.; Salatino, A. Unusual Chemical Composition of a Sample of Brazilian Propolis, as Assessed by Analysis of a Chloroform Extract - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research* **2003**, *42*, 53–56.
- (283) Negri, G.; Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F. Comb and Propolis Waxes from Brazil: Triterpenoids in Propolis Waxes - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research* **2000**, *39*, 86–88.
- (284) Schultz, G. P. Vascular Flora of the El Edén Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico1. *The Journal of the Torrey Botanical Society* **2009**, *132*, 311–322.
- (285) Peraza-Sánchez, S. R.; Peña-Rodríguez, L. M. Isolation of Picropolygamain from the Resin of *Bursera Simaruba*. *Journal of Natural Products* **1992**, *55*, 1768–1771.
- (286) Peraza-Sánchez, S. R.; Salazar-Aguilar, N. E.; Peña-Rodríguez, L. M. A New Triterpene from the Resin of *Bursera Simaruba*. *Journal of Natural Products* **1995**, *58*, 271–274.
- (287) Adelman, J.; Passos, M.; Breyer, D. H.; Dos Santos, M. H. R.; Lenz, C.; Leite, N. F.; Lanças, F. M.; Fontana, J. D. Exotic Flora Dependence of an Unusual Brazilian Propolis: The Pinoembrin Biomarker by Capillary Techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2007**, *43*, 174–178.
- (288) Ouattara, N. Situation des ressources génétiques forestières de la Côte d'Ivoire (Zone de savanes), 2001.
- (289) Guillaumet, J.-L.; Adjanohoun, E. La végétation de la Côte d'Ivoire. In *Le milieu naturel de la Côte d'Ivoire*; ORSTOM: Paris, 1971; pp. 161–263.
- (290) Garba, S.; Andrew, K.; Gayus, J. Antibacterial Activities of Total Alkaloids Extracted from Some Medicinal Plants. *Topclass Journal of Herbal Medicine* **2013**, *2*, 217–222.
- (291) Falodun, A.; Obasuyi, O. Phytochemical Screening and Evaluation of Stem Bark Extract of *Khaya Senegalensis* (Meliaceae) on Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Canadian. *Journal of Pure and Applied Sciences* **2009**, *31*, 925–928.
- (292) Ademola, I. O.; Fagbemi, B. O.; Idowu, S. O. Bioseparation and Activity of *Khaya Senegalensis* Fractions against Infective Larvae of *Haemonchus Contortus*. *Veterinary Parasitology* **2009**, *165*, 170–174.

- (293) Accioly, M. P.; Bevilaqua, C. M. L.; Rondon, F. C. M.; de Moraes, S. M.; Machado, L. K. A.; Almeida, C. A.; de Andrade Jr., H. F.; Cardoso, R. P. A. Leishmanicidal Activity in Vitro of *Musa Paradisiaca* L. and *Spondias Mombin* L. Fractions. *Veterinary Parasitology* **2012**, *187*, 79–84.
- (294) Soni, H.; Patel, S. S.; Mishra, K.; Nayak, G.; Singhai, A. K.; Pathak, A. K. Preliminary Pharmacognostical and Phytochemical Investigations of *Tamarindus Indica* Linn. Seeds. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* **2011**, *1*, 59–63.
- (295) Konaté, K.; Yomalan, K.; Sytar, O.; Zerbo, P.; Brestic, M.; Patrick, V. D.; Gagniu, P.; Barro, N. Free Radicals Scavenging Capacity, Antidiabetic and Antihypertensive Activities of Flavonoid-Rich Fractions from Leaves of *Trichilia Emetica* and *Opilia Amentacea* in an Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, *2014*, e867075.
- (296) Park, B.-Y.; Min, B.-S.; Kwon, O.-K.; Oh, S.-R.; Ahn, K.-S.; Kim, T.-J.; Kim, D.-Y.; Bae, K.; Lee, H.-K. Increase of Caspase-3 Activity by Lignans from *Machilus Thunbergii* in HL-60 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *27*, 1305–1307.
- (297) Beutler, J. A.; Shoemaker, R. H.; Johnson, T.; Boyd, M. R. Cytotoxic Geranyl Stilbenes from *Macaranga Schweinfurthii*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 1509–1512.
- (298) Leong, Y.-W.; Kang, C.-C.; Harrison, L. J.; Powell, A. D. Phenanthrenes, Dihydrophenanthrenes and Bibenzyls from the Orchid *Bulbophyllum Vaginatatum*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 157–165.
- (299) Katerere, D. R.; Gray, A. I.; Nash, R. J.; Waigh, R. D. Phytochemical and Antimicrobial Investigations of Stilbenoids and Flavonoids Isolated from Three Species of Combretaceae. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 932–940.
- (300) Majumder, P. L.; Guha, S.; Sen, S. Bibenzyl Derivatives from the Orchid *Dendrobium Amoenum*. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1365–1369.
- (301) Morishita, H.; Iwahashi, H.; Osaka, N.; Kido, R. Chromatographic Separation and Identification of Naturally Occurring Chlorogenic Acids by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1984**, *315*, 253–260.
- (302) Iwai, K.; Kishimoto, N.; Kakino, Y.; Mochida, K.; Fujita, T. In Vitro Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seven Hydroxycinnamoyl Derivatives in Green Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 4893–4898.
- (303) Erdogan, S.; Ates, B.; Durmaz, G.; Yilmaz, I.; Seckin, T. Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Anatolia Propolis and Their Radical Scavenging Capacities. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 1592–1597.
- (304) Fernandes-Silva, C. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F.; Breyer, E. D. H.; Negri, G. Chemical Profiling of Six Samples of Brazilian Propolis. *Química Nova* **2013**, *36*, 237–240.
- (305) Meneghelli, C.; Joaquim, L. S. D.; Félix, G. L. Q.; Somensi, A.; Tomazzoli, M.; da Silva, D. A.; Berti, F. V.; Veleirinho, M. B. R.; Recouvreux, D. de O. S.; de Mattos Zeri, A. C.; Dias, P. F.; Maraschin, M. Southern Brazilian Autumnal Propolis Shows Anti-Angiogenic Activity: An in Vitro and in Vivo Study. *Microvascular Research* **2013**, *88*, 1–11.
- (306) Ghosal, S.; Kumar, Y.; Singh, S.; Ahad, K. Biflorin, a Chromone-C-Glucoside from *Pancreatium Biflorum*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2591–2593.
- (307) Ito, H.; Kasajima, N.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Yoshida, T. Dimeric Flavonol Glycoside and Galloylated C-Glucosylchromones from *Kunzea Ambigua*. *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 411–415.
- (308) Ito, H.; Koreishi, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Yoshida, T. Cypellocarpins A–C, Phenol Glycosides Esterified with Oleuropeic Acid, from *Eucalyptus Cypellocarpa*. *Journal of Natural Products* **2000**, *63*, 1253–1257.
- (309) Zhang, Y.; Chen, Y. Isobiflorin, a Chromone C-Glucoside from Cloves (*Eugenia Caryophyllata*). *Phytochemistry* **1997**, *45*, 401–403.
- (310) Auzias, D.; Labourdette, J.-P. *Ouganda 2013-14*; Petit Futé, 2012.
- (311) Saharia, G. S.; Sharma, M. Chemical Examination of *Acacia Senegal* Willd. *Indian Journal of Forestry* **1981**, *4*, 63.
- (312) Jain, R.; Sharma, P.; Bhagchandani, T.; Jain, S. C. Phytochemical Investigation and Antimicrobial Activity of *Acacia Senegal* Root Heartwood. *Journal of Pharmacy Research* **2012**, *5*, 4934–4938.
- (313) Prakash, L.; Singh, M. Triterpenoids and Other Constituents of *Acacia Tortilis* Wild. *Journal of the Indian Chemical Society* **1986**, *63*, 853–854.
- (314) Joshi, K. C.; Tholia, M. K.; Sharma, T. Chemical Examination of *Acacia Modesta*. *Planta Medica* **1975**, *27*, 281–283.
- (315) Pedernera, A. M.; Guardia, T.; Calderón, C. E. G.; Rotelli, A. E.; Rocha, N. E. de la; Saad, J. R.; Verrilli, M. A. L.; Aseff, S. G.; Pelzer, L. E. Anti-Inflammatory Effect of *Acacia Visco* Extracts in Animal Models. *Inflammopharmacology* **2010**, *18*, 253–260.
- (316) White, F. *La Vegetation de L'Afrique (The Vegetation of Africa)*; IRD Editions, 1986.

- (317) Shih, M.-F.; Cheng, Y.-D.; Shen, C.-R.; Cherng, J.-Y. A Molecular Pharmacology Study into the Anti-Inflammatory Actions of *Euphorbia Hirta* L. on the LPS-Induced RAW 264.7 Cells through Selective iNOS Protein Inhibition. *Journal of Natural Medicines* **2010**, *64*, 330–335.
- (318) Guelz, P. G.; Bodden, J.; Mueller, E.; Marner, F. J. Epicuticular Wax of *Euphorbia Aphylla* Brouss. Ex. Willd., Euphorbiaceae. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **1988**, *43*, 19–23.
- (319) Awad, N. E.; Abou Zeid, A. H. S.; El-Missiry, M. M. Constituents of the Hexane Extract of the Latex of *Euphorbia Pseudocactus* A. Berger. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)* **1993**, *31*, 257–258.
- (320) Choi, J. W.; Cho, E. J.; Lee, D. G.; Choi, K.; Ku, J.; Park, K.-W.; Lee, S. Antibacterial Activity of Triterpenoids from *Clerodendron Trichotomum*. *Journal of Applied Biological Chemistry* **2012**, *55*, 169–172.
- (321) Chung, P. Y.; Chung, L. Y.; Navaratnam, P. Transcriptional Profiles of the Response of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* to Pentacyclic Triterpenoids. *PLoS One* **2013**, *8*, e56687.
- (322) Cota, B. B.; Johann, S.; Oliveira, D. M.; Siqueira, E. P.; Souza-Fagundes, E. M.; Cisalpino, P. S.; Alves, T. M. A.; Zani, C. L. Biological Potential of *Stillingia Opositifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 70–77.
- (323) Irshad, M.; Ahmad, A.; Zafaryab, M.; Ahmad, F.; Manzoor, N.; Singh, M.; Rizvi, M. M. A. Composition of *Cassia Fistula* Oil and Its Antifungal Activity by Disrupting Ergosterol Biosynthesis. *Natural product communications* **2013**, *8*, 261–264.
- (324) Sharma, S.; Singh, T.; Vijayvergia, R. Antimicrobial Properties of Beta-Amyrin (Terpenoid). *JPR: BioMedRx: An International Journal* **2010**, *3*, 1979–1980.
- (325) Propolis Pour Préparations Homéopathiques, In: Pharmacopée française, 11^{ème} édition, **2012**. Disponible en ligne sur le site www.anm.sante.fr

Annexes

ANNEXE 1 : Taux de PT, FF et FD des extraits de propolis E01-08

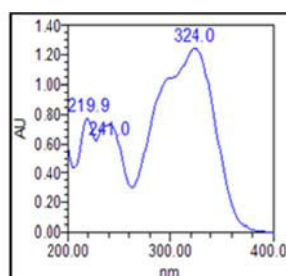
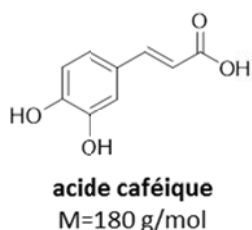
Valeurs des taux de polyphénols totaux (PT), de flavones/flavonols (FF) et de flavanones/dihydroflavonols (FD) pour les différents extraits de propolis E01-08

Extraits	PT (mg GAE/g)	FF (mg QE/g)	FD (mg NE/g)
E01 EtOH 70	246.3 ± 10.6	69.3 ± 3.7	158.6 ± 8.5
E02 MeOH	238.7 ± 13.3	66.4 ± 4.9	156.8 ± 3.1
E03 EtOH 95	253.6 ± 5.1	67.0 ± 2.6	153.1 ± 2.5
E04-2 DCM	273.5 ± 6.8	78.6 ± 2.7	176.0 ± 9.9
E05-1 Aq	279.5 ± 22.4	27.6 ± 1.5	94.9 ± 2.6
E05-2 EtOH 90	246.5 ± 10.9	68.5 ± 1.0	154.8 ± 8.9
E06-2 DCM	181.3 ± 9.2	61.0 ± 0.5	133.1 ± 2.8
E07-2 Aq	305.7 ± 3.8	32.1 ± 1.5	97.8 ± 2.9
E07-3 DCM	247.4 ± 8.8	82.5 ± 4.8	159.0 ± 10.8
E08-2 mixte	281.0 ± 7.1	80.0 ± 1.2	156.0 ± 10.2

ANNEXE 2 : Etude structurale préliminaire de six polyphénols commerciaux

1) Acide caféique (4)

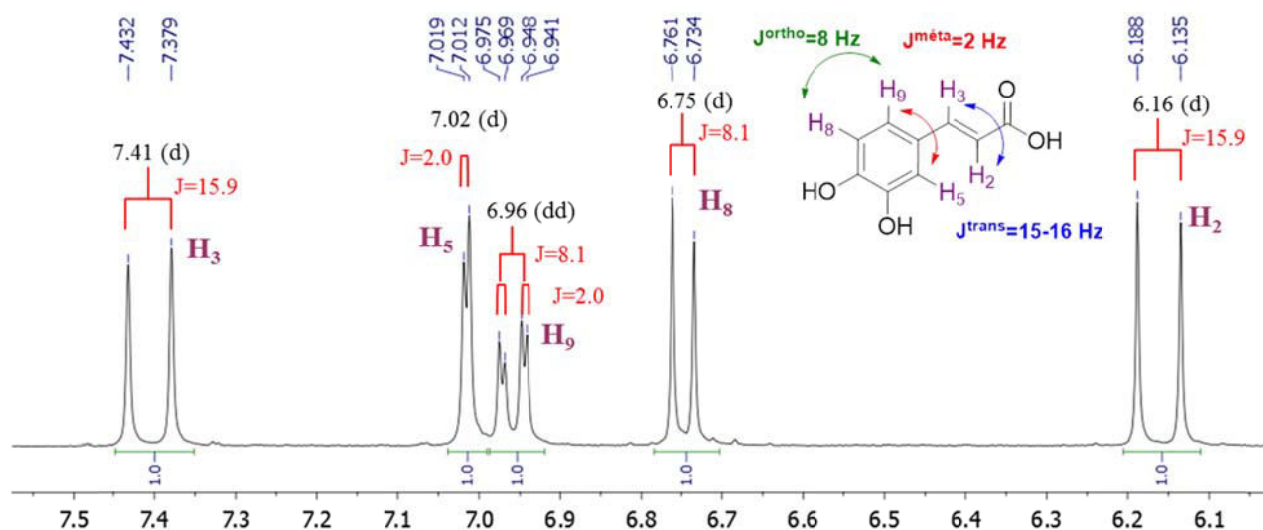
L'acide caféique fait partie de la famille des acides hydroxycinnamiques, et possède deux fonctions phénols libres. Son spectre UV présente des maxima d'absorption λ_{\max} à 298 et 324 nm.



Structure et spectre UV de l'acide caféique (Acros, 99%)

Son spectre RMN ^1H , réalisé dans le DMSO, présente trois singulets (s) d'intégration 1 à δ 12.13, 9.55 et 9.14 ppm, caractéristiques respectivement du proton de l'acide carboxylique et des deux protons phénoliques. Il possède également un ensemble de 5 signaux entre δ 6.1 et 7.5 ppm détaillés dans le spectre suivant.

Acide caféique, DMSO, 300 MHz



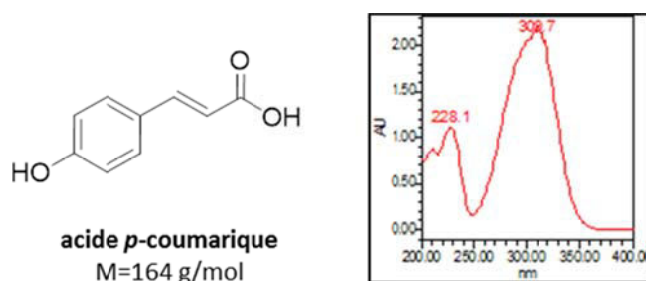
Spectre RMN ^1H (zone δ 6.1-7.5 ppm) de l'acide caféique (300 MHz, DMSO, δ_{TMS} 0 ppm)

Deux doublets (d) de grande constante de couplage ($J=15.9$ Hz) sont observés à δ 6.16 et 7.41 ppm. Il s'agit d'une constante de couplage entre deux protons situés sur une double liaison en position *trans*. De plus, le proton en position β par rapport au carbonyle (H_3)

subissant l'effet mésomère attracteur de ce dernier, sera plus déblindé, c'est-à-dire décalé vers les hauts ppm (7.41 ppm). Le signal à δ 6.16 ppm, quant à lui, correspond au proton H_2 . Les autres signaux possèdent des constantes de couplage de protons aromatiques. H_9 possède à la fois un proton voisin en ortho et un autre en méta, ce sera donc un doublet dédoublé (dd), il s'agit du signal à δ 6.96 ppm ($J=8.1, 2.0$ Hz). H_8 ne possède qu'un voisin en ortho, car la constante de couplage para est négligeable, c'est donc le doublet à δ 6.75 ppm ($J=8.1$ Hz). Quant à H_5 , il ne possède qu'un voisin en méta, il s'agit du doublet à δ 7.02 ppm ($J=2.0$ Hz).

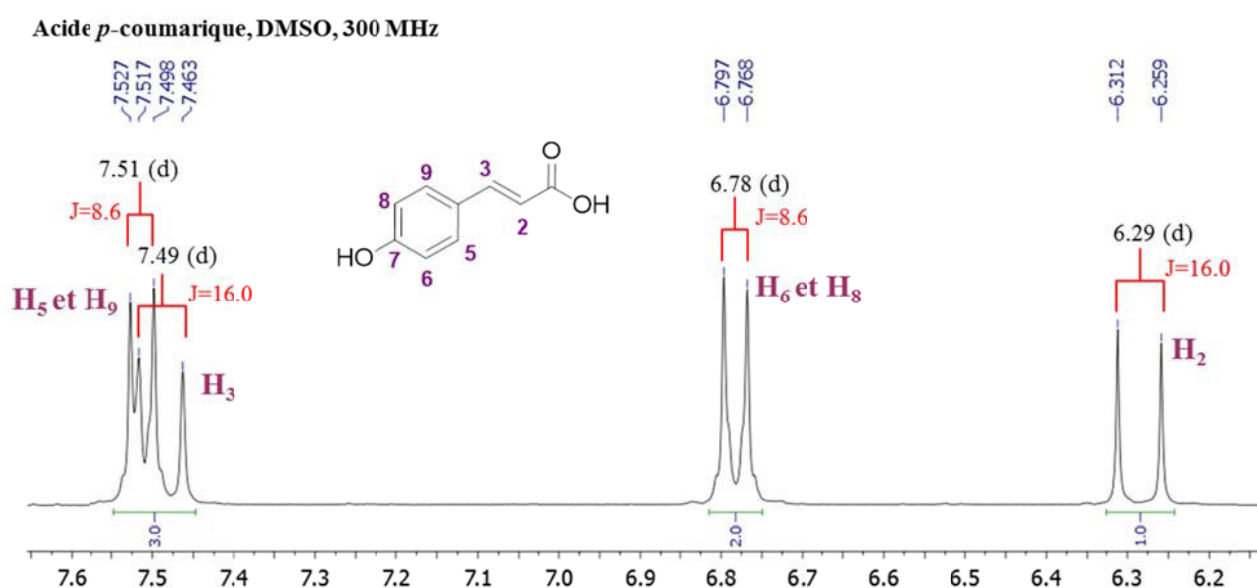
2) Acide *p*-coumarique (7)

L'acide *p*-coumarique fait lui aussi partie de la famille des acides hydroxycinnamiques, mais il ne possède qu'une seule fonction phénol libre. Son spectre UV présente un maximum d'absorption λ_{\max} à 310 nm.



Structure et spectre UV de l'acide *p*-coumarique (Sigma, 98%)

Son spectre RMN 1H , réalisé dans le DMSO, présente deux singulets d'intégration 1 à δ 12.15 et 9.97 ppm, caractéristiques du proton de l'acide carboxylique et du phénol. Il possède également un ensemble de plusieurs signaux entre δ 6.2 et 7.6 ppm.

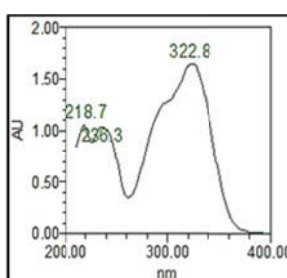
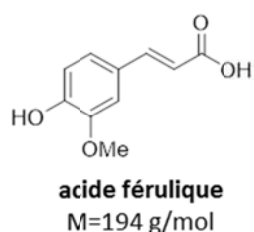


Spectre RMN 1H (zone δ 6.2-7.6 ppm) de l'acide *p*-coumarique (300 MHz, DMSO, δ_{TMS} 0 ppm)

L'acide *p*-coumarique possède les mêmes signaux (d, $J=16.0$ Hz) d'intégration 1 pour les protons éthyléniques H_2 et H_3 que l'acide caféique. Mais cette fois-ci, un seul groupement hydroxyle est en *para*, on va donc observer deux doublets de couplage ortho ($J=8.6$ Hz) d'intégration 2 car les protons sont équivalents deux à deux. H_5 et H_9 , du côté du carbonyle α - β insaturé, seront plus déblindés (δ 7.51 ppm) alors que H_6 et H_8 , proches du OH seront plus blindés (δ 6.78 ppm).

3) Acide férulique (8)

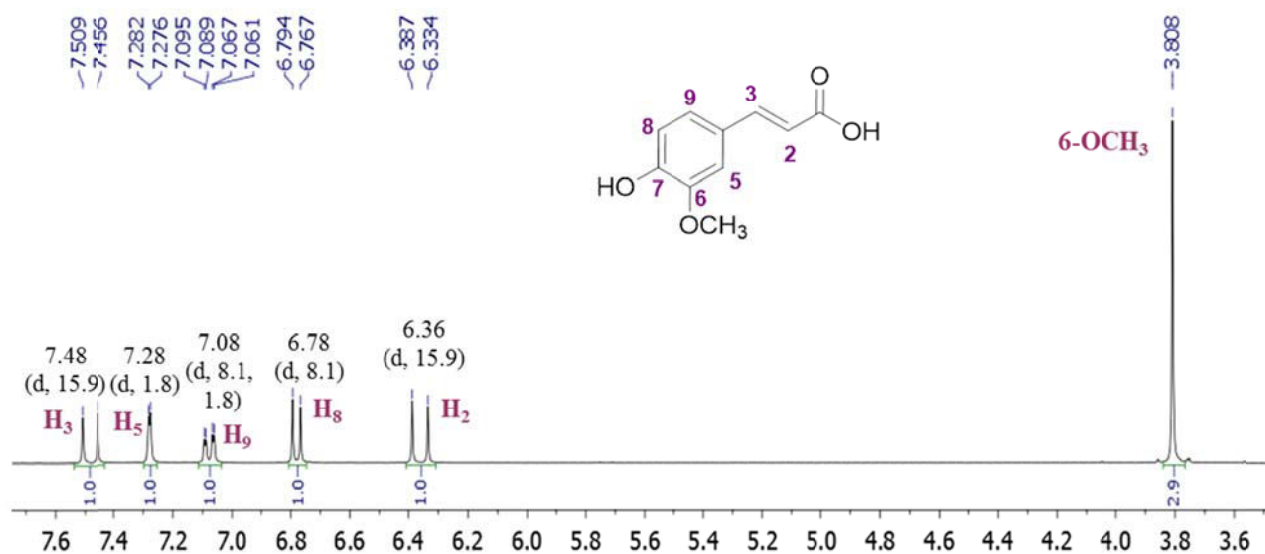
L'acide férulique fait lui aussi partie de la famille des acides hydroxycinnamiques. C'est un dérivé de l'acide caféique dont un des deux groupements phénols est méthoxylé. Son spectre UV présente un maximum d'absorption λ_{\max} à 298 et 323 nm.



Structure et spectre UV de l'acide férulique (Aldrich, 99%)

Son spectre RMN 1H , réalisé dans le DMSO, présente aussi deux singulets d'intégration 1 à δ 12.13 et 9.56 ppm, caractéristiques du proton de l'acide carboxylique et du phénol. Il possède également un ensemble de plusieurs signaux entre δ 6.2 et 7.6 ppm, comme l'acide caféique, et surtout un singulet d'intégration 3 à δ 3.81 ppm pour le groupement méthoxyle.

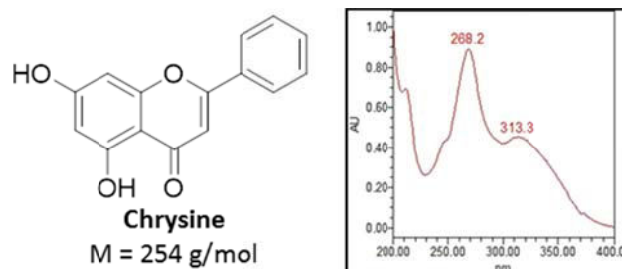
Acide férulique, DMSO, 300 MHz



Spectre RMN 1H (zone δ 3.6-7.6 ppm) de l'acide férulique (300 MHz, DMSO, δ_{TMS} 0 ppm)

4) Chryisine (34)

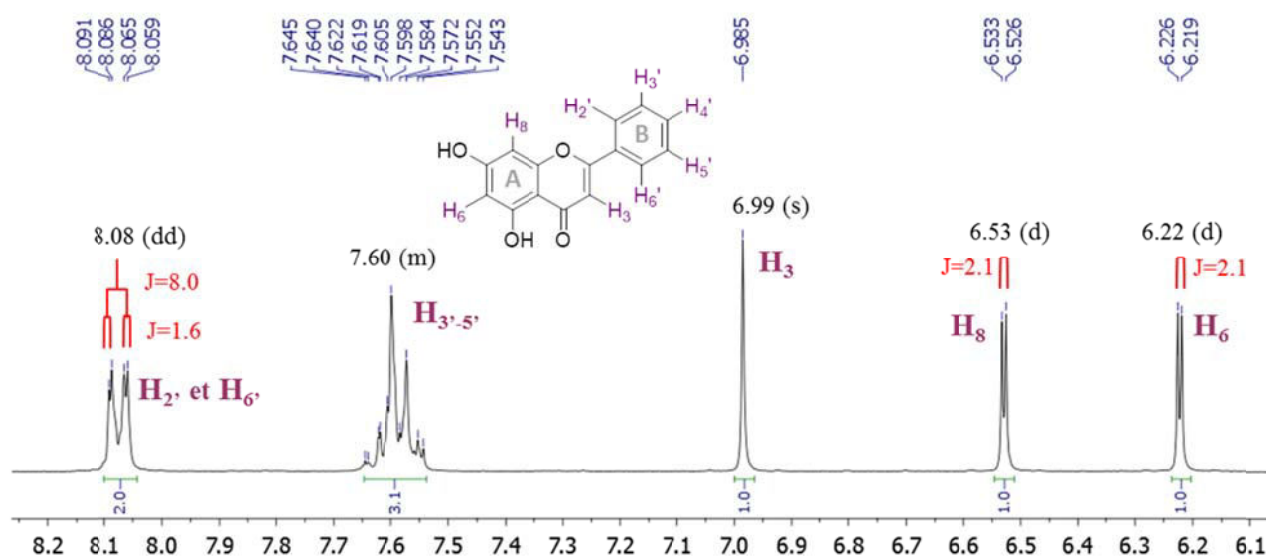
La chryisine fait partie de la famille des flavonoïdes et plus spécialement des flavones, et possède deux fonctions phénols libres. Son spectre UV présente des maxima d'absorption λ_{\max} à 268 et 313 nm.



Structure et spectre UV de la chryisine (Acros, 99%)

Son spectre RMN ^1H , réalisé dans le DMSO, présente deux singulets d'intégration 1 à δ 12.84 et 10.93 ppm, caractéristiques des protons phénoliques. Il possède également un ensemble de 5 signaux entre δ 6.1 et 8.2 ppm détaillés dans le spectre suivant.

Chryisine, DMSO, 300 MHz

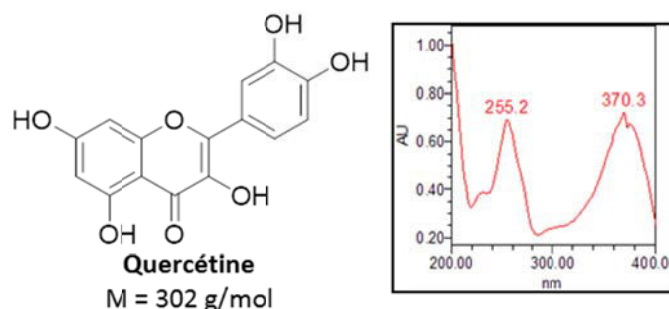


Spectre RMN ^1H (zone δ 6.1-8.2 ppm) de la chryisine (300 MHz, DMSO, δ_{TMS} 0 ppm)

Les deux doublets à δ 6.22 et 6.53 ppm, de constante de couplage $J=2.1$ Hz et d'intégration 1, correspondent aux deux protons aromatiques situés sur le cycle A H_6 et H_8 . Le proton H_3 sort sous forme de singlet à δ 6.99 ppm. Les 5 protons du cycle aromatique (cycle B) sont répartis en deux signaux : un multiplet à δ 7.60 ppm d'intégration 3, correspondant à $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{4'}$ et $\text{H}_{5'}$ et un doublet dédoublé d'intégration 2 correspondant aux deux protons en ortho $\text{H}_{2'}$ et $\text{H}_{6'}$.

5) Quercétine (18)

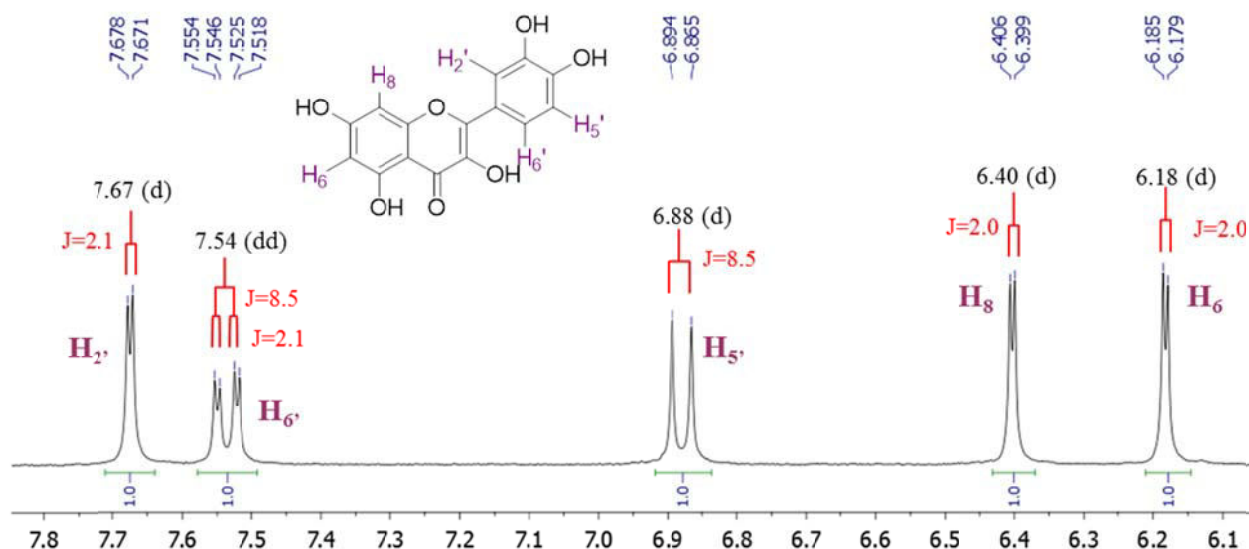
La quercétine fait elle aussi partie de la famille des flavonoïdes et plus spécialement des flavonols, et possède en tout 5 fonctions phénols libres. Son spectre UV présente des maxima d'absorption λ_{\max} à 255 et 370 nm.



Structure et spectre UV de la quercétine (Sigma, 98%)

Son spectre RMN ^1H , réalisé dans le DMSO, présente 5 singulets d'intégration 1 à δ 12.50, 10.79, 9.60, 9.39 et 9.32 ppm, caractéristiques des protons phénoliques et énoïque. Il possède également un ensemble de 5 signaux entre δ 6.1 et 7.8 ppm.

Quercétine, DMSO, 300 MHz

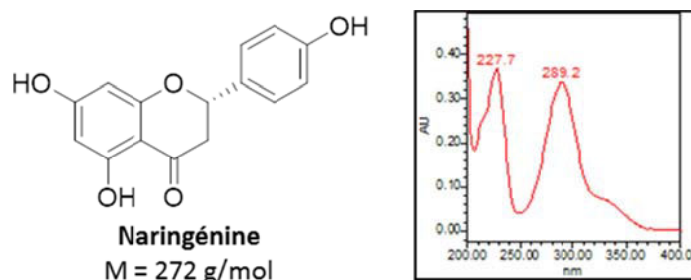


Spectre RMN ^1H (zone δ 6.1-7.8 ppm) de la quercétine (300 MHz, DMSO, δ_{TMS} 0 ppm)

On retrouve les deux doublets de constante de couplage métra ($J=2.0$ Hz) d'intégration 1 correspondant aux deux protons aromatiques H_6 et H_8 (δ 6.18 et 6.40 ppm). On retrouve aussi les trois signaux des protons situés sur un cycle aromatique 1,3,4-trisubstitué comme dans l'acide caféique mais avec des déplacements chimiques différents (zone δ 6.8-7.8 vs zone δ 6.7-7.1 ppm pour l'acide caféique).

6) Naringénine (16)

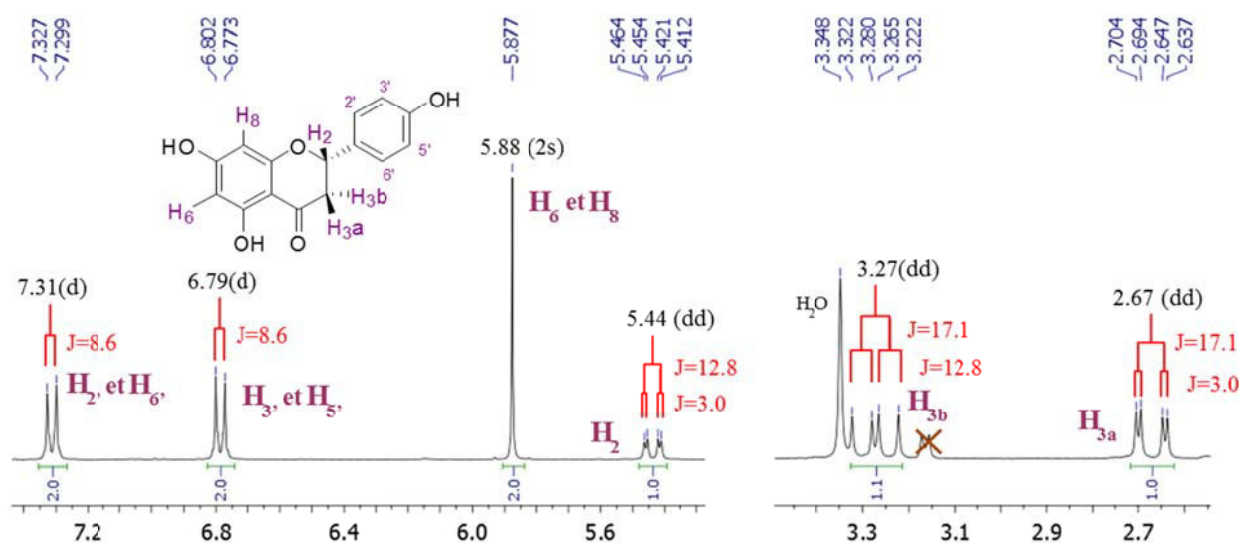
La naringénine fait elle aussi partie de la famille des flavonoïdes et plus spécialement des flavanones, et possède 3 fonctions phénols libres. Son spectre UV présente des maxima d'absorption λ_{\max} à 289 et 330sh nm.



Structure et spectre UV de la naringénine (Sigma, 98%)

Son spectre RMN ^1H , réalisé dans le DMSO, présente 3 singulets d'intégration 1 à δ 12.15, 10.79 et 9.60 ppm, caractéristiques des protons phénoliques. Il possède également un ensemble de 6 signaux sur deux zones δ 2.6-3.4 et 5.4-7.3 ppm détaillées dans le spectre suivant.

Naringénine, DMSO, 300 MHz



Spectre RMN ^1H (zones δ 2.6-3.4 et 5.4-7.3 ppm) de la naringénine (300 MHz, DMSO, δ_{TMS} 0 ppm)

Le motif flavanone est constitué de trois signaux d'intégration 1 :

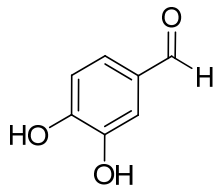
- un doublet dédoublé à δ 5.44 ppm, donc assez déblindé, correspondant au proton H_2 qui subit l'effet inductif attracteur de l'oxygène en position 1, avec une grande constante de couplage type axial ($J=12.8$ Hz) avec H_{3b} et une plus petite type équatorial ($J=3.0$ Hz) avec H_{3a} .

- un doublet dédoublé à δ 3.27 ppm correspondant à H_{3b} avec une des constantes de couplage $J=12.8$ Hz (avec H_2) et la plus grande $J=17.1$ Hz avec H_{3a} .
- un doublet dédoublé à δ 2.67 ppm correspondant donc à H_{3a} avec une des constantes de couplage $J=3.0$ Hz (avec H_2) et la même grande constante de couplage $J=17.1$ Hz avec H_{3b} .

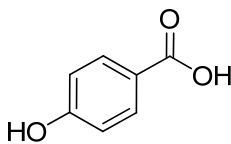
Dans le cas de la naringénine, les deux protons aromatiques du cycle A, H_6 et H_8 , sont regroupés sous un seul et même signal ressemblant à un singulet d'intégration 2 à δ 5.88 ppm, alors que ce devrait être deux doublets avec $J=2$ Hz. C'est comme s'ils étaient équivalents (ou isochrones). Le cycle B est disubstitué en position para, ainsi les protons $H_{3'}$ et $H_{5'}$ sortent sous forme de doublet ($J=8.6$ Hz) d'intégration 2 à δ 6.79 ppm et $H_{2'}$ et $H_{6'}$ à δ 7.31 ppm.

ANNEXE 3 : Récapitulatif des composés identifiés dans la propolis BFA (méthode 1)

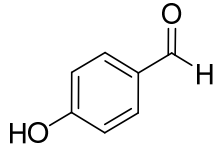
Composé 1

Nom	3,4-dihydroxybenzaldéhyde	
Formule brute	C ₇ H ₆ O ₃	
Masse molaire	138 g/mol	
Temps de rétention	3.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	280, 312 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 137	[M+H] ⁺ : 139
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, références ^{44,184} CF2-13	

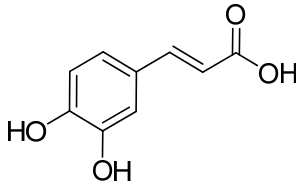
Composé 2

Nom	Acide 4-hydroxybenzoïque	
Formule brute	C ₇ H ₆ O ₃	
Masse molaire	138 g/mol	
Temps de rétention	4.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	255 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 137	
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, références ^{44,183} CF2-13	

Composé 3

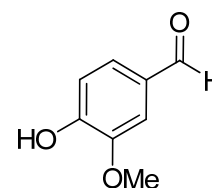
Nom	4-hydroxybenzaldéhyde	
Formule brute	C ₇ H ₆ O ₂	
Masse molaire	122 g/mol	
Temps de rétention	5.4 min	
Profil UV (λ_{\max})	230, 274sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 121	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 6.91 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.77 (d, J=8.4Hz, 2H), 9.75 (s, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 115.8, 115.9, 130.3, 132.2(x2), 158.9, 193.0	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{44,188,189} CF2-9	

Composé 4

Nom	Acide caféique	
Formule brute	C ₉ H ₈ O ₄	
Masse molaire	180 g/mol	
Temps de rétention	5.5 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 325 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 179 ; MS ² 179, 135	[M+H] ⁺ -H ₂ O : 163
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (DMSO, 300 MHz) : 6.16 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.75 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.96 (dd, J=8.1, 2.0Hz, 1H), 7.02 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.41 (d, J=15.9Hz, 1H), 9.14 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 12.13 (s, 1H) (standard commercial)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, standard commercial, références ^{63,71,74} (CF2-23)	

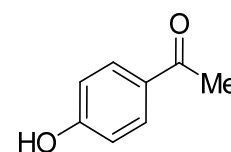
Composé 5

Nom	Vanilline	
Formule brute	C ₈ H ₈ O ₃	
Masse molaire	152 g/mol	
Temps de rétention	6.2 min	
Profil UV (λ_{\max})	281, 311 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 151 ; MS ² 136	[M+H] ⁺ : 153 ; MS ² 125
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 3.92 (s, 3H), 6.94 (d, J=6.6Hz, 1H), 7.42 (dd, J=6.6, 1.7Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 9.74 (s, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 56.4, 104.9, 111.3, 120.8, 131.2, 148.0, 149.0, 193.0	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{8,44,74,189} CF2-9	

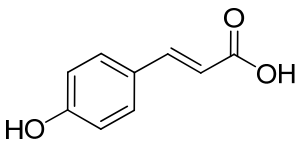


Composé 6

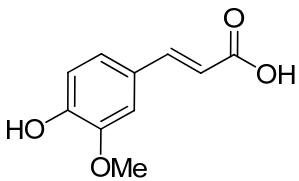
Nom	4-hydroxyacétophénone	
Formule brute	C ₈ H ₈ O ₂	
Masse molaire	136 g/mol	
Temps de rétention	6.5 min	
Profil UV (λ_{\max})	278 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 135	[M+H] ⁺ : 137
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 2.53, (s, 3H), 6.83 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.88 (d, J=8.6Hz, 2H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 26.2, 116.3(x2), 129.1, 132.2(x2), 164.0, 199.7	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{44,188,190} CF2-9	



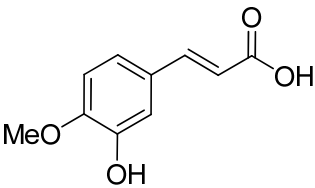
Composé 7

Nom	Acide <i>p</i>-coumarique	
Formule brute	C ₉ H ₈ O ₃	
Masse molaire	164 g/mol	
Temps de rétention	8.2 min	
Profil UV (λ_{\max})	310 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 163 ; MS ² 119	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (DMSO, 300 MHz) : 6.29 (d, J=16.0Hz, 1H), 6.78 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.49 (d, J=16.0Hz, 1H), 7.51 (d, J=8.6Hz, 2H), 9.97 (s, 1H), 12.15 (s, 1H) (standard commercial)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, standard commercial, références ^{63,71,74} (CF2-14&15)	

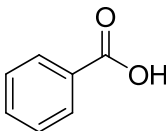
Composé 8

Nom	Acide férulique	
Formule brute	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	
Masse molaire	194 g/mol	
Temps de rétention	8.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 323 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 193 ; MS ² 178, 149, 134	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (DMSO, 300 MHz) : 3.81 (s, 3H), 6.36 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.78 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.08 (dd, J=8.1, 1.8Hz, 1H), 7.28 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.48 (d, J=15.9Hz, 1H), 9.56 (s, 1H), 12.13 (s, 1H) (standard commercial)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, standard commercial, références ^{63,71,74} (CF2-15)	

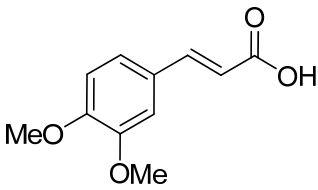
Composé 9

Nom	Acide isoférulique	
Formule brute	$C_{10}H_{10}O_4$	
Masse molaire	194 g/mol	
Temps de rétention	9.7 min	
Profil UV (λ_{max})	298, 323 nm	
Données MS (m/z)	$[M-H]^-$: 193 ; MS^2 178, 149, 134	
Données RMN (δ en ppm)	1H (CD_3OD , 270 MHz) : 3.88 (s, 3H), 6.33 (d, $J=16.0Hz$, 1H), 6.97 (d, $J=8.4Hz$, 1H), 7.09 (d, $J=8.4, 2.0Hz$, 1H), 7.16 (d, $J=2.0Hz$, 1H), 7.53 (d, $J=16.0Hz$, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN 1H , références ^{63,74} CF2-18 et CF2-19	

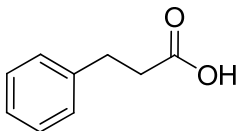
Composé 10

Nom	Acide benzoïque	
Formule brute	$C_7H_6O_2$	
Masse molaire	122 g/mol	
Temps de rétention	11.0 min	
Profil UV (λ_{max})	230, 274sh nm	
Données MS (m/z)	$[M-H]^-$: 121	
Données RMN (δ en ppm)	1H (CD_3OD , 270 MHz) : 7.46 (td, $J=7.7, 1.4Hz$, 2H), 7.54 (tt, $J=7.7, 1.4Hz$, 1H), 8.01 (dd, $J=8.4, 1.4Hz$, 2H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN 1H , standard commercial, références ^{13,74,180} CF2-6	

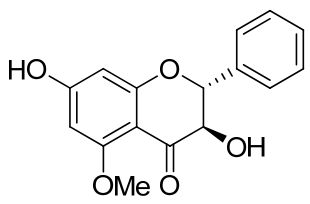
Composé 11

Nom	Acide 3,4-diméthoxycinnamique	
Formule brute	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	
Masse molaire	208 g/mol	
Temps de rétention	12.6 min	
Profil UV (λ_{\max})	295, 323 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 207 ; MS ² 163, 149, 133	[M+H] ⁺ : 209 ; [M+Na] ⁺ : 231 [M+H] ⁺ -H ₂ O : 177 ; MS ² 163
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 3.87 (2s, 6H), 6.36 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.97 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.15 (d, J=8.4, 2.0Hz, 1H), 7.20 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.59 (d, J=15.9Hz, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références CF2-13	

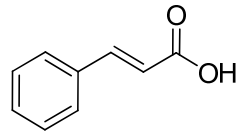
Composé 12

Nom	Acide 3-phénylpropanoïque	
Formule brute	C ₉ H ₁₀ O ₂	
Masse molaire	150 g/mol	
Temps de rétention	13.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	250 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 149 ; MS ² 105	[M+Na] ⁺ : 173
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 3.33 (t, J=7.6, 2H), 3.65 (t, J=7.6, 2H), 7.97 (m, 5H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 32.2, 37.2, 127.2, 129.4(x2), 129.5(x2), 142.4, 174.1	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{74,185} CF2-7	

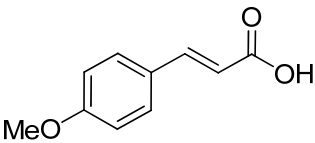
Composé 13

Nom	5-méthylpinobanksine	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	
Masse molaire	286 g/mol	
Temps de rétention	15.9 min	
Profil UV (λ_{\max})	288, 330sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 285	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 3.85 (s, 3H), 4.40 (d, J=11.7Hz, 1H), 5.03 (d, J=11.7Hz, 1H), 6.00 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.13 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.44 (m, 5H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H, références ^{63,74} CF2-19	

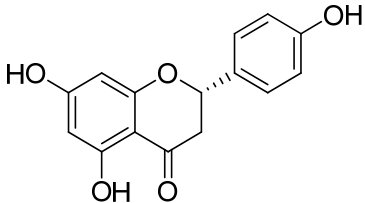
Composé 14

Nom	Acide cinnamique	
Formule brute	C ₉ H ₈ O ₂	
Masse molaire	148 g/mol	
Temps de rétention	15.9 min	
Profil UV (λ_{\max})	277 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 147	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 6.48 (d, J=15.9Hz, 1H), 7.39 (m, 3H), 7.59 (m, 2H), 7.65 (d, J=15.9Hz, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, standard commercial, références ^{63,71,74} CF2-8 et CF2-9	

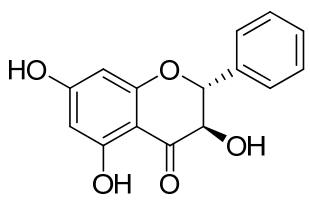
Composé 15

Nom	Acide 4-méthoxycinnamique	
Formule brute	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	
Masse molaire	178 g/mol	
Temps de rétention	16.6 min	
Profil UV (λ_{\max})	308 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 177	[M+H] ⁺ : 179 ; [M+Na] ⁺ : 201 MS ² [M+H] ⁺ -H ₂ O : 161, 133
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, références ^{44,74} CF2-11&12	

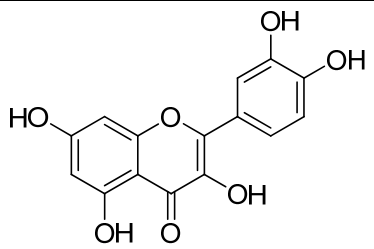
Composé 16

Nom	Naringénine	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	
Masse molaire	272 g/mol	
Temps de rétention	16.9 min	
Profil UV (λ_{\max})	289, 330sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 271 ; MS ² 177, 151	[M+H] ⁺ : 273 ; MS ² 153
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (DMSO, 300 MHz) : 2.67 (dd, J=17.1, 2.9Hz, 1H), 3.27 (dd, J=17.1, 12.9 Hz, 1H), 5.44 (dd, J=12.9, 2.9Hz, 1H), 5.88 (s, 2H), 6.79 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.31 (d, J=8.6Hz, 2H), 9.60 (s, 1H), 10.79 (s, 1H), 12.15 (s, 1H) (standard commercial)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, standard commercial, références ⁷¹ (CF2-13)	

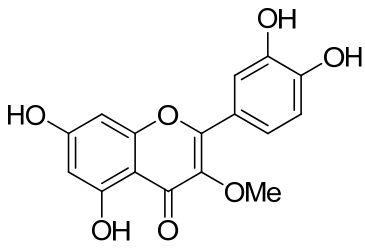
Composé 17

Nom	Pinobanksine	
Formule brute	$C_{15}H_{12}O_5$	
Masse molaire	272 g/mol	
Temps de rétention	16.9 min	
Profil UV (λ_{max})	292, 330sh nm	
Données MS (m/z)	$[M-H]^-$: 271	
Données RMN (δ en ppm)	1H (CD_3OD , 270 MHz) : 4.55 (d, $J=11.6Hz$, 1H), 5.08 (d, $J=11.6Hz$, 1H), 5.90 (d, $J=2.1Hz$, 1H), 5.94 (d, $J=2.1Hz$, 1H), 7.41 (m, 3H), 7.53 (m, 2H) ^{13}C (DMSO, 67.5 MHz) : 71.4, 85.3, 89.2, 96.1, 100.4, 128.0(x2), 128.2(x2), 128.6, 137.3, 162.4, 163.3, 166.9, 197.6	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN 1H et ^{13}C , références ^{51,63,74,182} CF2-9	

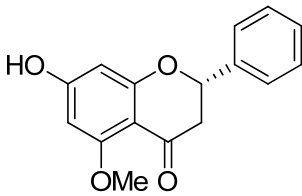
Composé 18

Nom	Quercétine	
Formule brute	$C_{15}H_{10}O_7$	
Masse molaire	302 g/mol	
Temps de rétention	17.0 min	
Profil UV (λ_{max})	255, 370 nm	
Données MS (m/z)	$[M-H]^-$: 301 ; MS^2 179, 151	
Données RMN (δ en ppm)	1H (DMSO, 300 MHz) : 6.18 (d, $J=2.0Hz$, 1H), 6.40 (d, $J=2.0Hz$, 1H), 6.88 (d, $J=8.5Hz$, 1H), 7.54 (dd, $J=8.5, 2.1Hz$, 1H), 7.67 (d, $J=2.1Hz$, 1H), 9.32 (s, 1H), 9.39 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 10.79 (s, 1H), 12.50 (s, 1H) (standard commercial)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN 1H , standard commercial, références ^{51,63,71} (CF2-11)	

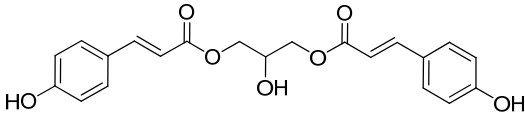
Composé 19

Nom	3-méthylquercétine	
Formule brute	$C_{16}H_{12}O_7$	
Masse molaire	316 g/mol	
Temps de rétention	18.3 min	
Profil UV (λ_{max})	256, 355 nm	
Données MS (m/z)	$[M-H]^-$: 315 ; MS^2 300	$[M+H]^+$: 317 ; $[M+H]^+$: 339 MS^2 302
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, références ^{63,191} E09-2 (DCM) et CF2-18	

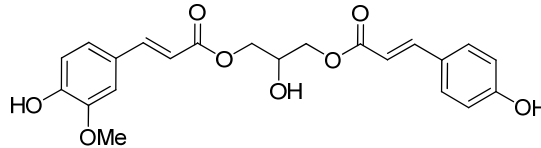
Composé 20

Nom	5-méthylpinocembrine	
Formule brute	$C_{16}H_{14}O_4$	
Masse molaire	270 g/mol	
Temps de rétention	18.8 min	
Profil UV (λ_{max})	288, 330sh nm	
Données MS (m/z)	$[M-H]^-$: 269 ; $[2M-H]^-$: 539 MS^2 254, 227, 165	$[M+Na]^+$: 293 ; $[2M+Na]^+$: 563
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 2.72 (dd, J=16.7, 3.2Hz, 1H), 3.00 (dd, J=16.7, 12.4 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 5.43 (dd, J=12.4, 3.2Hz, 1H), 6.05 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.10 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.43 (m, 5H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H, références ¹⁹¹ CF2-20	

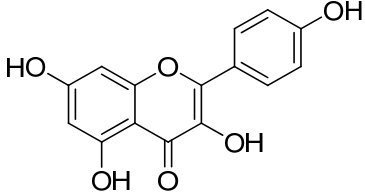
Composé 21

Nom	1,3-dicoumaroylglycérol	
Formule brute	C ₂₁ H ₂₁ O ₇	
Masse molaire	384 g/mol	
Temps de rétention	19.0 min	
Profil UV (λ_{\max})	314 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 383 ; MS ² 219, 163	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 4.10-4.35 (m, 5H), 6.36 (d, J=15.9, 2H), 6.79 (d, J=8.6Hz, 4H), 7.45 (d, J=8.6Hz, 4H), 7.66 (d, J=15.9Hz, 2H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H, références ^{199,200} CF2-20	

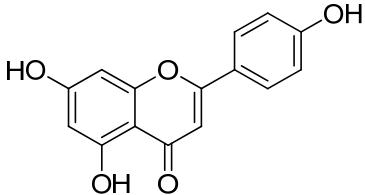
Composé 22

Nom	1-féruloyl-3-coumaroyl glycérol	
Formule brute	C ₂₂ H ₂₂ O ₈	
Masse molaire	414 g/mol	
Temps de rétention	19.0 min	
Profil UV (λ_{\max})	295, 314 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 414 ; MS ² 235, 193, 177, 137	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (DMSO, 270 MHz) : 3.87 (s, 3H), 4.10-4.35 (m, 5H), 6.36 (d, J=15.9, 1H), 6.39 (d, J=15.9, 1H), 6.79 (d, J=8.6Hz, 3H), 7.02 (dd, J=8.6, 2.2Hz, 1H), 7.18 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.45 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.66 (d, J=15.9Hz, 2H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H, références ^{199,201} CF2-20	

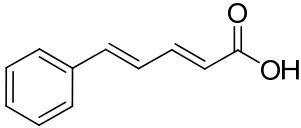
Composé 23

Nom	Kaempférol	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	
Masse molaire	286 g/mol	
Temps de rétention	19.9 min	
Profil UV (λ_{\max})	266, 364 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 285	
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, références ^{63,191} E09-2 (DCM)	

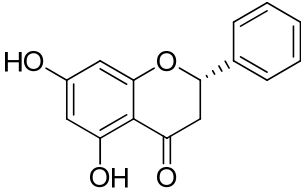
Composé 24

Nom	Apigénine	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	
Masse molaire	270 g/mol	
Temps de rétention	20.4 min	
Profil UV (λ_{\max})	268, 337 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 269 ; [2M-H] ⁻ : 539	
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, références ^{31,51,63,191} CF2-15	

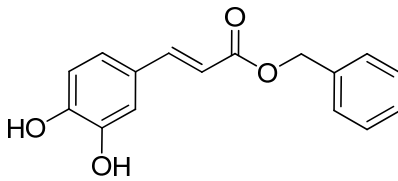
Composé 25

Nom	Acide cinnamylidène acétique	
Formule brute	C ₁₁ H ₁₀ O ₂	
Masse molaire	174 g/mol	
Temps de rétention	21.3 min	
Profil UV (λ_{\max})	312 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 173	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 6.01 (d, J=15.1Hz, 1H), 6.99 (m, 2H), 7.41 (m, 6H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 122.8, 127.6, 128.4(x2), 129.5, 129.9(x2), 137.7, 141.7, 146.5, 168.9	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{31,51,63,191,192} CF2-9	

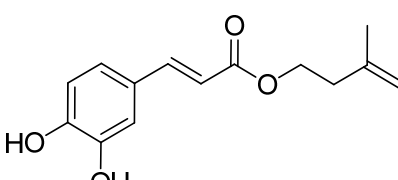
Composé 26

Nom	Pinocembrine	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	
Masse molaire	256 g/mol	
Temps de rétention	22.8 min	
Profil UV (λ_{\max})	288, 330sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 255 ; MS ² 177, 151	[M+H] ⁺ : 257 ; [M+Na] ⁺ : 279 MS ² 213
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 2.77 (dd, J=17.1, 3.1Hz, 1H), 3.10 (dd, J=17.1, 12.7Hz, 1H), 5.47 (dd, J=12.7, 3.1Hz, 1H), 5.89 (d, J=2.2Hz, 1H), 5.93 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.43 (m, 5H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{63,71,74,181} CF2-6	

Composé 27

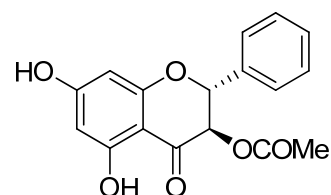
Nom	Caféate de benzyle	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	
Masse molaire	270 g/mol	
Temps de rétention	22.8 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 330 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 269 ; [2M-H] ⁻ : 539 MS ² 178, 134	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 5.21 (s, 2H), 6.30 (d, J=15.7Hz, 1H), 6.76 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.94 (dd, J=8.1, 2.1Hz, 1H), 7.03 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.35 (m, 5H), 7.57 (d, J=15.7Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 67.2, 115.1, 115.3, 116.6, 123.1, 127.8, 129.2, 129.3(x2), 129.6(x2), 138.0, 147.0, 147.3, 149.8, 169.1	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{63,74,191,194} CF2-11	

Composé 28

Nom	caféate d'isopent-3-ènyle	
Formule brute	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	
Masse molaire	248 g/mol	
Temps de rétention	28.2 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 330 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 247 ; [2M-H] ⁻ : 495 MS ² 179	[M+H] ⁺ : 249 ; [M+Na] ⁺ : 271 ; [2M+Na] ⁺ : 519 ; MS ² 181
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) : 1.79 (m, 3H), 2.42 (t, J=6.8Hz, 2H), 4.28 (t, J=6.8Hz, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.82 (m, 1H), 6.23 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.76 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.93 (dd, J=8.1, 2.2Hz, 1H), 7.02 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.52 (d, J=15.9Hz, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ⁷⁴ CF2-10	

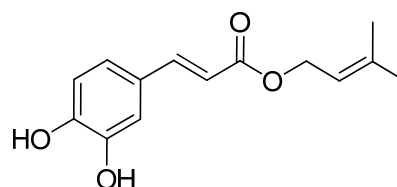
Composé 29

Nom	Pinobanksine-3-acétate	
Formule brute	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	
Masse molaire	314 g/mol	
Temps de rétention	23.2 min	
Profil UV (λ_{\max})	293, 330sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 313 ; MS ² 253	[M+H] ⁺ : 315 ; [M+Na] ⁺ : 337
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 1.96 (s, 3H), 5.41 (d, J=11.7Hz, 1H), 5.83 (d, J=11.7Hz, 1H), 5.95 (d, J=2.1Hz, 1H), 5.96 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.41 (m, 3H), 7.51 (m, 2H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 20.2, 73.8, 82.5, 96.8, 97.9, 102.2, 128.8(x2), 129.7(x2), 130.5, 137.3, 164.2, 165.6, 169.4, 170.9, 193.1	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{31,63,71,74,182} CF2-8	

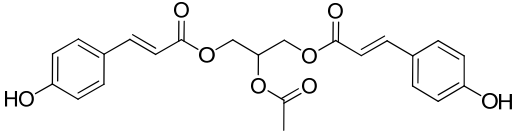


Composé 30

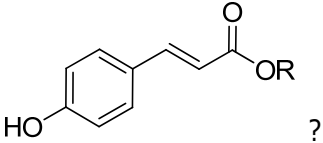
Nom	Caféate de prényle	
Formule brute	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	
Masse molaire	248 g/mol	
Temps de rétention	23.2 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 324 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 247 ; [2M-H] ⁻ : 495 MS ² 179, 134	[M+Na] ⁺ : 271 ; [2M+Na] ⁺ : 519 ; MS ² 203
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) : 1.75 (d, J=0.8Hz, 3H), 1.78 (d, J=0.8Hz, 3H), 4.67 (d, J=7.3Hz, 2H), 5.40 (t, J=7.3Hz, 1H), 6.23 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.76 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.93 (dd, J=8.1, 2.2Hz, 1H), 7.02 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.52 (d, J=15.9Hz, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{33,63,74} CF2-10	



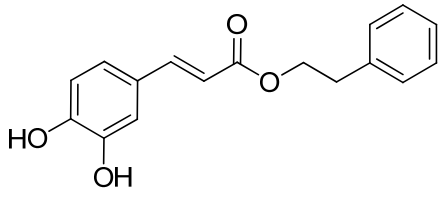
Composé 31

Nom	2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol	
Formule brute	C ₂₃ H ₂₂ O ₈	
Masse molaire	426 g/mol	
Temps de rétention	23.2 min	
Profil UV (λ_{\max})	316 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 425 ; [2M-H] ⁻ : 851 MS ² 365, 163	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (DMSO, 270 MHz) : 2.08 (s, 3H), 4.30 (dd, J=12.0, 5.9Hz, 2H), 4.40 (dd, J=12.0, 3.9 Hz, 2H), 5.28 (m, 1H), 6.41 (d, J=16.0, 2H), 6.78 (d, J=8.5Hz, 4H), 7.56 (d, J=8.5Hz, 4H), 7.57 (d, J=16.0Hz, 2H), 10.05 (s, 2H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{31,103} CF2-17	

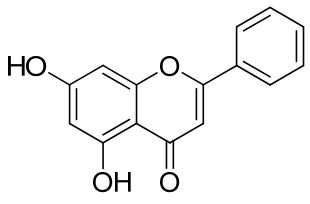
Composé 32 (non identifié)

Nom	Dérivé d'acide p-coumarique	
Formule brute	?	
Masse molaire	326 ? 434 g/mol? Autre ?	
Temps de rétention	23.2 min	
Profil UV (λ_{\max})	268, 310 nm	
Données MS (m/z)	433 MS ² 163	[M+Na] ⁺ : 349 ; [2M+Na] ⁺ : 675
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	- CF2-13	

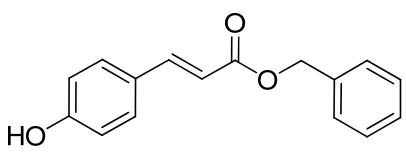
Composé 33

Nom	Caféate de phényléthyle	
Formule brute	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	
Masse molaire	284 g/mol	
Temps de rétention	24.4 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 330 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 283 ; [2M-H] ⁻ : 567 MS ² 179, 135	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 2.99 (t, J=7.0Hz, 2H), 4.36 (t, J=7.0Hz, 2H), 6.22 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.76 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.92 (dd, J=8.1, 2.0Hz, 1H), 7.01 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.27 (m, 5H), 7.50 (d, J=15.9Hz, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{51,63,74,191} CF2-11	

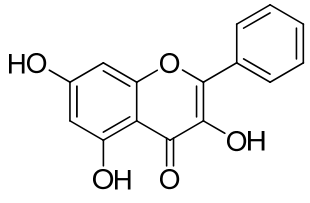
Composé 34

Nom	Chryisine	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	
Masse molaire	254 g/mol	
Temps de rétention	24.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	268, 313sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 253 ;	[M+H] ⁺ : 255 ; [M+Na] ⁺ : 277
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (DMSO, 300 MHz) : 6.22 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.53 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.60 (m, 3H), 8.08 (dd, J=8.0, 1.6Hz, 2H), 10.93 (s, 1H), 12.84 (s, 1H) (standard commercial)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, standard commercial, références ^{31,51,63,71} (CF2-9)	

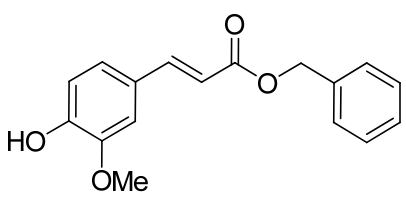
Composé 35

Nom	<i>p</i>-coumarate de benzyle	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	
Masse molaire	254 g/mol	
Temps de rétention	25.4 min	
Profil UV (λ _{max})	314 nm	
Données MS (<i>m/z</i>)	[M-H] ⁻ : 253	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 5.19 (s, 2H), 6.34 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.78 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.36 (m, 5H), 7.42 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.62 (d, J=15.9Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 67.2, 115.1, 116.9(x2), 127.3, 128.9, 129.3(x2), 129.5, 129.7(x2), 131.3(x2), 137.9, 146.9, 161.4, 169.2	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{38,63,74,186} CF2-7	

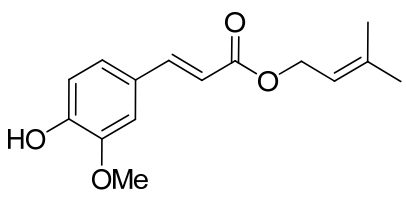
Composé 36

Nom	Galangine	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	
Masse molaire	270 g/mol	
Temps de rétention	25.7 min	
Profil UV (λ _{max})	265, 313sh, 358 nm	
Données MS (<i>m/z</i>)	[M-H] ⁻ : 269 ; [2M-H] ⁻ : 539	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 6.18 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.39 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.46 (m, 3H), 8.17 (dd, J=8.4, 1.6Hz, 2H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 94.6, 99.5, 104.7, 128.8(x2), 129.5(x2), 131.0, 132.7, 138.6, 147.0, 158.6, 162.7, 166.1, 177.8	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{51,63,71,74,187} CF2-7	

Composé 37

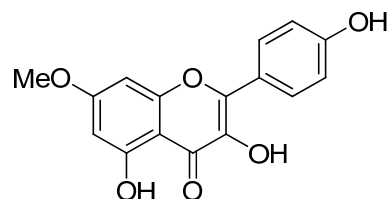
Nom	Férulate de benzyle	
Formule brute	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	
Masse molaire	284 g/mol	
Temps de rétention	25.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 324 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 283 ; MS ² 268, 192	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) : 3.88 (s, 3H), 5.21 (s, 2H), 6.41 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.80 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.07 (dd, J=8.1, 1.8Hz, 1H), 7.18 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.36 (m, 5H), 7.64 (d, J=15.9Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) : 56.4, 67.2, 111.7, 115.3, 116.4, 124.2, 127.7, 129.1, 129.2(x2), 129.6(x2), 137.8, 146.4, 149.3, 150.7, 169.0	
Identification par	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, RMN 2D COSY, HMQC, HMBC, NOESY, références ^{31,38,74}	
Fraction source	CF2-6	

Composé 38

Nom	Férulate de prényle	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	
Masse molaire	262 g/mol	
Temps de rétention	25.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 324 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 261	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) : 1.75 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.67 (d, J=7.2Hz, 2H), 5.40 (t, J=7.2Hz, 1H), 6.34 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.80 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.06 (dd, J=8.0, 2.0Hz, 1H), 7.17 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.59 (d, J=15.9Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) : 18.0, 25.9, 56.4, 62.2, 111.6, 115.6, 116.4, 120.1, 124.1, 127.6, 139.9, 147.1, 149.3, 150.6, 169.2	
Identification par	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, ¹³ C, 2D COSY, HMQC, HMBC, NOESY, références ^{31,74}	
Fraction source	CF2-6	

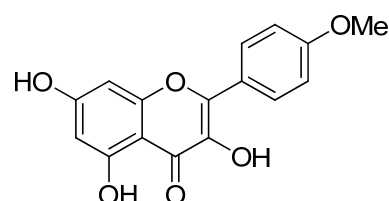
Composé 39

Nom	Rhamnocitrine	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	
Masse molaire	300 g/mol	
Temps de rétention	25.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	265, 364 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 299 ; MS ² 284, 165	[M+H] ⁺ : 301 ; [M+Na] ⁺ : 323 ; MS ² 255, 139
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃) ₂ CO, 270 MHz) : 3.93 (s, 3H), 6.32 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.70 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.02 (d, J=8.9Hz, 2H), 8.18 (d, J=8.9Hz, 2H), 12.13 (s, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H, références ^{32,193} CF2-9	

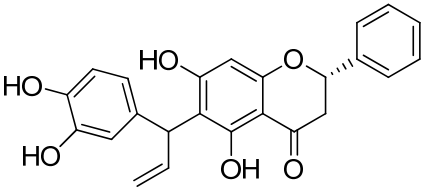


Composé 40

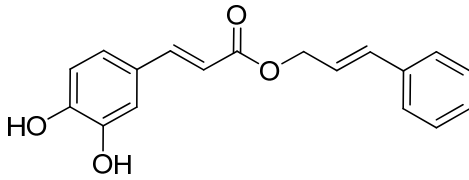
Nom	Kaempféride	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	
Masse molaire	300 g/mol	
Temps de rétention	25.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	267, 364 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 299 ; MS ² 284, 165	[M+H] ⁺ : 301 ; [M+Na] ⁺ : 323 ; MS ² 255, 139
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃) ₂ CO, 270 MHz) : 3.90 (s, 3H), 6.27 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.54 (d, J=1.9Hz, 1H), 7.11 (d, J=8.9Hz, 2H), 8.22 (d, J=8.9Hz, 2H), 12.15 (s, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H, références ^{191,193} CF2-9	



Composé 41 (nouveau)

Nom	6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-èn-1-yl]pinocembrine	
Formule brute	C ₂₄ H ₂₀ O ₆	
Masse molaire	404 g/mol	
Temps de rétention	25.7 min	
Profil UV (λ_{\max})	293, 340sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 403 ; [2M-H] ⁻ : 807 MS ² 293	[M+H] ⁺ : 405 ; [M+Na] ⁺ : 427 MS ² 295, 191
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 2.76 (dd, J=17.0, 3.2Hz, 1H), 3.09 (dd, J=17.0, 12.7 Hz, 1H), 5.04 (dd, J=10.0, 2.4Hz, 1H), 5.10 (d, J=8.5Hz, 1H), 5.11 (dd, J=16.2, 2.4Hz, 1H), 5.44 (dd, J=12.7, 3.2Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 6.61 (dd, J=8.4, 1.8Hz, 1H), 6.64 (ddd, J=16.2, 10.0, 8.5Hz 1H), 6.67 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.79 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.42 (m, 5H) ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) : 44.4, 44.5, 80.5, 95.9, 103.3, 112.3, 115.2, 115.7, 116.0, 119.9, 127.4(x2), 129.7, 129.8(x2), 136.5, 140.6, 141.2, 144.0, 145.6, 162.8(x2), 166.1, 197.6	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, COSY, HMQC, HMBC, références ^{70,326} CF2-13	

Composé 42

Nom	Caféate de cinnamyle	
Formule brute	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	
Masse molaire	296 g/mol	
Temps de rétention	26.4 min	
Profil UV (λ_{\max})	298, 330 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 295 ; [2M-H] ⁻ : 591 ; MS ² 178, 134	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 4.83 (dd, J=6.5, 1.4Hz, 2H), 6.31 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.40 (dt, J=15.9, 6.5Hz, 1H), 6.72 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.77 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.96 (dd, J=8.1, 2.1Hz, 1H), 7.05 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.29 (m, 3H), 7.43 (m, 2H), 7.58 (d, J=15.9Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 66.0, 115.1, 115.3, 116.6, 123.1, 124.7, 127.7 (x2), 127.8, 129.1, 129.7(x2), 135.1, 137.9, 146.9, 147.2, 149.7, 169.1	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{44,51,63,191} CF2-11	

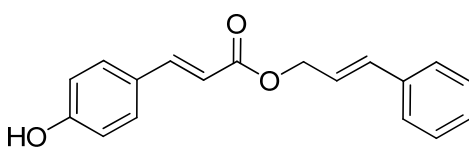
Composé 43 (nouveau)

Nom	8-[(E)-phénylprop-2-èn-1-one]-5-méthoxycatéchine	
Formule brute	C ₂₅ H ₂₂ O ₇	
Masse molaire	434 g/mol	
Temps de rétention	27.4 min	
Profil UV (λ_{\max})	350 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 433 HRESIMS : [M+H] ⁺ : 435.1436	[M+H] ⁺ : 435 ; [M+Na] ⁺ : 457 MS ² 417, 331, 283
Données RMN (δ en ppm)	¹ H ((CD ₃) ₂ CO, 270 MHz) : 2.53 (dd, J=16.2, 9.5Hz, 1H), 3.07 (dd, J=16.2, 5.7 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.21 (m, 1H), 4.68 (d, J=8,9Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 6.91 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.96 (dd, J=8.4, 1.4Hz, 1H), 7.11 (d, J=1.4Hz, 1H), 7.22 (m, 5H), 7.63 (d, J=15.7Hz, 1H), 8.06 (d, J=15.7Hz, 1H), 14.49 (s, 1H) ¹³ C ((CD ₃) ₂ CO, 125 MHz) : 30.6, 56.5, 66.8, 84.2, 93.5, 102.5, 105.9, 116.0, 116.2, 121.3, 128.4, 129.2(x2), 129.7(x2), 130.7, 130.8, 136.2, 143.1, 146.2, 146.6, 157.6, 165.1, 168.1, 193.2	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H et ¹³ C, COSY, HMQC, HMBC, NOESY, références ¹⁵⁹ CF2-18	

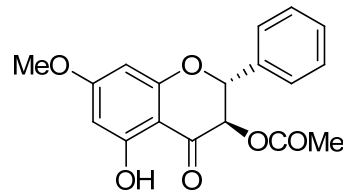
Composé 44

Nom	Isoférulate de cinnamyle	
Formule brute	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	
Masse molaire	310 g/mol	
Temps de rétention	28.5 min	
Profil UV (λ_{\max})	293, 326 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 309 ; MS ² 294	[M+Na] ⁺ : 333 ; MS ² 289
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 3.86 (s, 3H), 4.81 (dd, J=6.3, 1.3Hz, 2H), 6.34 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.37 (dt, J=15.9, 6.3Hz, 1H), 6.69 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.90 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.03 (dd, J=8.4, 2.1Hz, 1H), 7.07 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.20-7.45 (m, 5H), 7.59 (d, J=15.9Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 56.4, 66.1, 112.6, 115.0, 116.2, 122.9, 124.7, 127.8(x2), 129.0(x2), 129.1, 129.8, 135.2, 137.9, 146.9, 148.2, 151.7, 169.0	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H et ¹³ C, 2D NOESY, références ^{31,74} CF2-8	

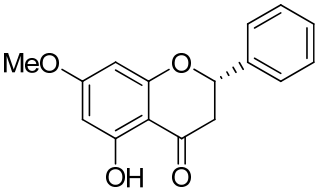
Composé 45

Nom	<i>p</i>-coumarate de cinnamyle	
Formule brute	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	
Masse molaire	280 g/mol	
Temps de rétention	28.5 min	
Profil UV (λ _{max})	311 nm	
Données MS (<i>m/z</i>)	[M-H] ⁻ : 279	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 270 MHz) : 4.81 (dd, J=6.5, 1.5Hz, 2H), 6.35 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.37 (dt, J=15.7, 6.5Hz, 1H), 6.69 (d, J=15.7Hz, 1H), 6.79 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.18-7.52 (m, 5H), 7.44 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.63 (d, J=15.9Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 67.5 MHz) : 66.0, 115.1, 116.9(x2), 124.7, 127.2, 127.7(x2), 128.8, 129.7(x2), 131.3, 135.1, 137.9, 146.8, 161.4, 169.1	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{31,63,74} CF2-7	

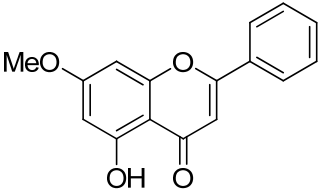
Composé 46

Nom	Alpinone-3-acétate	
Formule brute	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	
Masse molaire	328 g/mol	
Temps de rétention	28.5min	
Profil UV (λ _{max})	293, 330sh nm	
Données MS (<i>m/z</i>)		[M+H] ⁺ : 329 ; [M+Na] ⁺ : 351 [2M+Na] ⁺ : 679 ; MS ² 287, 269, 241
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 270 MHz) : 2.04 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.37 (d, J=11.6Hz, 1H), 5.82 (d, J=11.6Hz, 1H), 6.07 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.13 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.54 (m, 2H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{31,70,196} CF2-4	

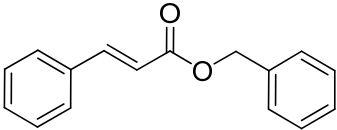
Composé 47

Nom	Pinostrobine	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	
Masse molaire	270 g/mol	
Temps de rétention	28.5 min	
Profil UV (λ_{\max})	290, 330sh nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 269 ; MS ² 165	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 270 MHz) : 2.83 (dd, J=17.2, 3.1Hz, 1H), 3.11 (dd, J=17.2, 13.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 5.43 (dd, J=13.0, 3.1Hz, 1H), 6.07 (d, J=2.3Hz, 1H), 6.09 (d, J=2.3Hz, 1H), 7.43 (m, 5H), 12.02 (s, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{31,71,74,179} CF2-2	

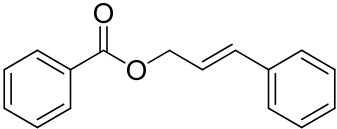
Composé 48

Nom	Tectochrysin	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	
Masse molaire	268 g/mol	
Temps de rétention	30.1 min	
Profil UV (λ_{\max})	271, 311sh nm	
Données MS (m/z)		
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 270 MHz) : 3.90 (s, 3H), 6.39 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.52 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 7.50 (m, 3H), 8.08 (m, 2H), 12.70 (s, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{31,51,74,195} CF2-5	

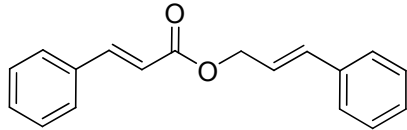
Composé 49

Nom	Cinnamate de benzyle	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	
Masse molaire	238 g/mol	
Temps de rétention	30.1 min	
Profil UV (λ_{\max})	281 nm	
Données MS (m/z)		
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 270 MHz) : 5.26 (s, 2H), 6.49 (d, J=15.9Hz, 1H), 7.40 (m, 6H), 7.52 (m, 4H), 7.73 (d, J=15.9Hz, 1H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H, références ^{31,197} CF2-1	

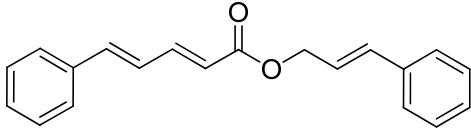
Composé 50

Nom	Benzoate de cinnamyle	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	
Masse molaire	238 g/mol	
Temps de rétention	31.1 min	
Profil UV (λ_{\max})	251 nm	
Données MS (m/z)		
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 270 MHz) : 4.75 (dd, J=6.5, 1.4Hz, 2H), 6.28 (dt, J=15.9, 6.5Hz, 1H), 6.65 (d, J=15.9Hz, 1H), 7.15-7.22 (m, 10H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ^{31,198} CF2-1	

Composé 51

Nom	Cinnamate de cinnamyle	
Formule brute	C ₁₈ H ₁₆ O ₂	
Masse molaire	264 g/mol	
Temps de rétention	32.6 min	
Profil UV (λ_{\max})	275 nm	
Données MS (m/z)		[M+Na] ⁺ : 287 ; [2M+Na] ⁺ : 551
Données RMN (δ en ppm)	-	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, références ³¹ CF2-1	

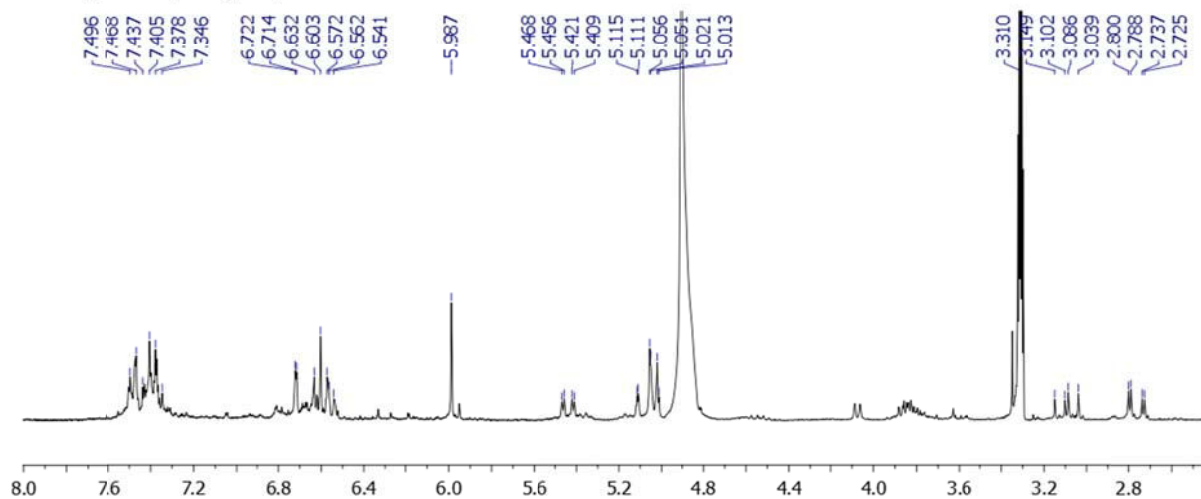
Composé 52

Nom	Cinnamyle cinnamylidène acétate	
Formule brute	C ₂₀ H ₁₈ O ₂	
Masse molaire	290g/mol	
Temps de rétention	34.5 min	
Profil UV (λ_{\max})	313 nm	
Données MS (m/z)		[M+Na] ⁺ : 313; [2M+Na] ⁺ : 603
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 270 MHz) : 4.85 (dd, J=6.5, 1.4Hz, 2H), 6.04 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.35 (dt, J=15.9, 6.5Hz, 1H), 6.70 (d, J=15.9Hz, 1H), 6.90 (m, 2H), 7.35 (m, 11H)	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ⁷⁰ CF2-1	

ANNEXE 4 : Spectres RMN de la 6-[(3'',4''-dihydroxyphényl)prop-2-èn-1-yl]pinocembrine (41)

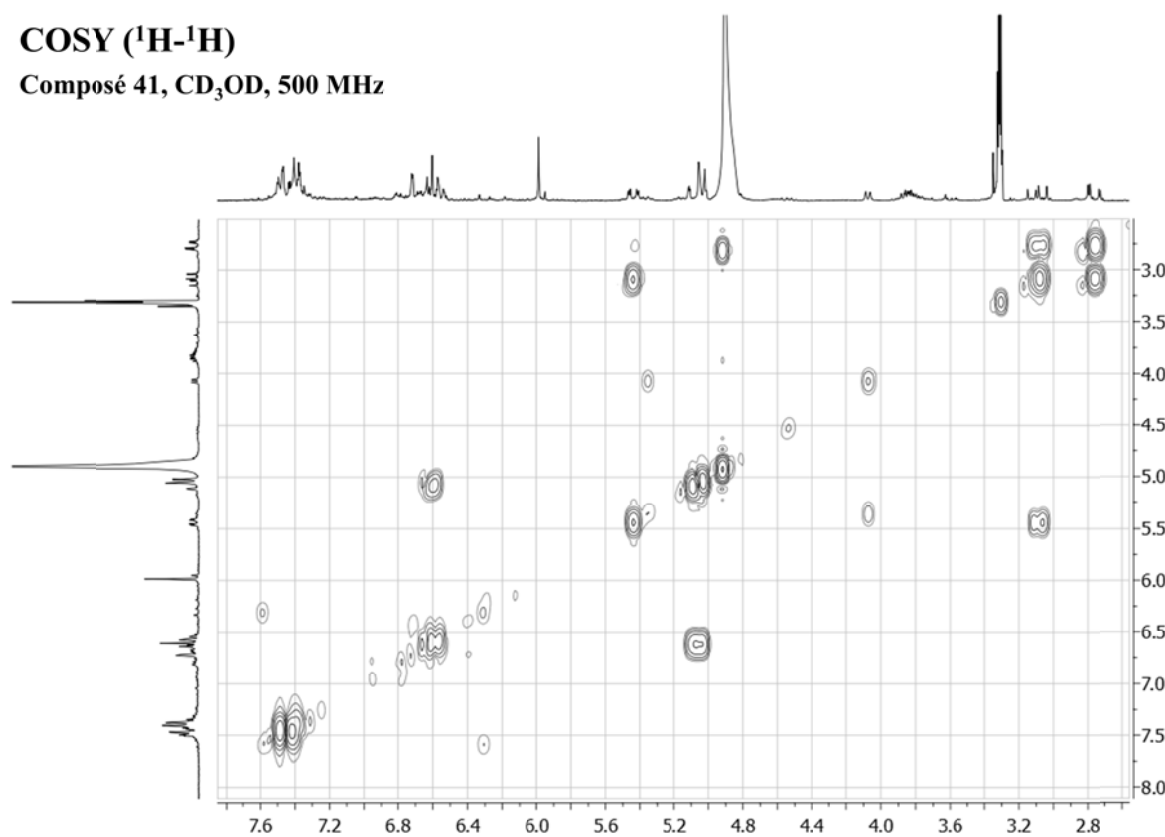
RMN ^1H

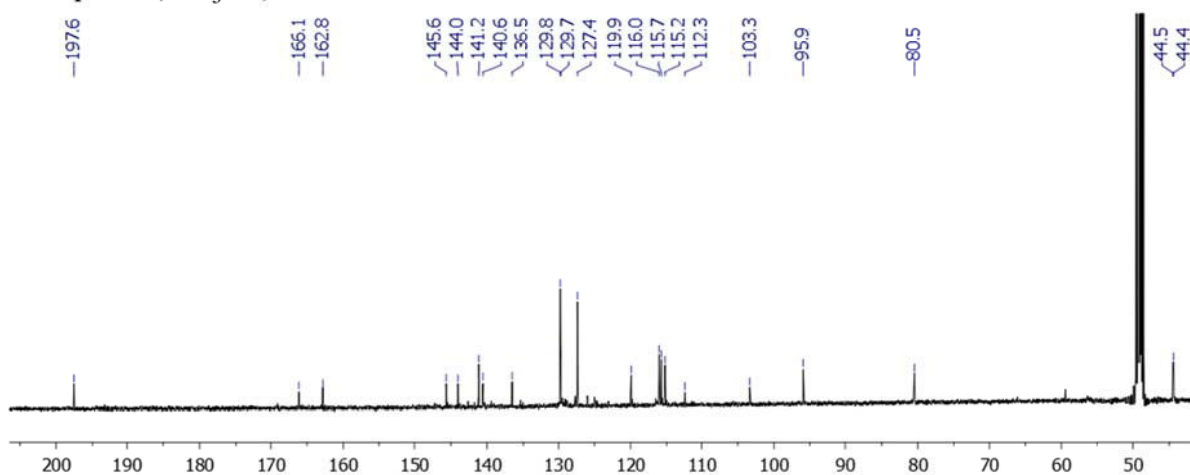
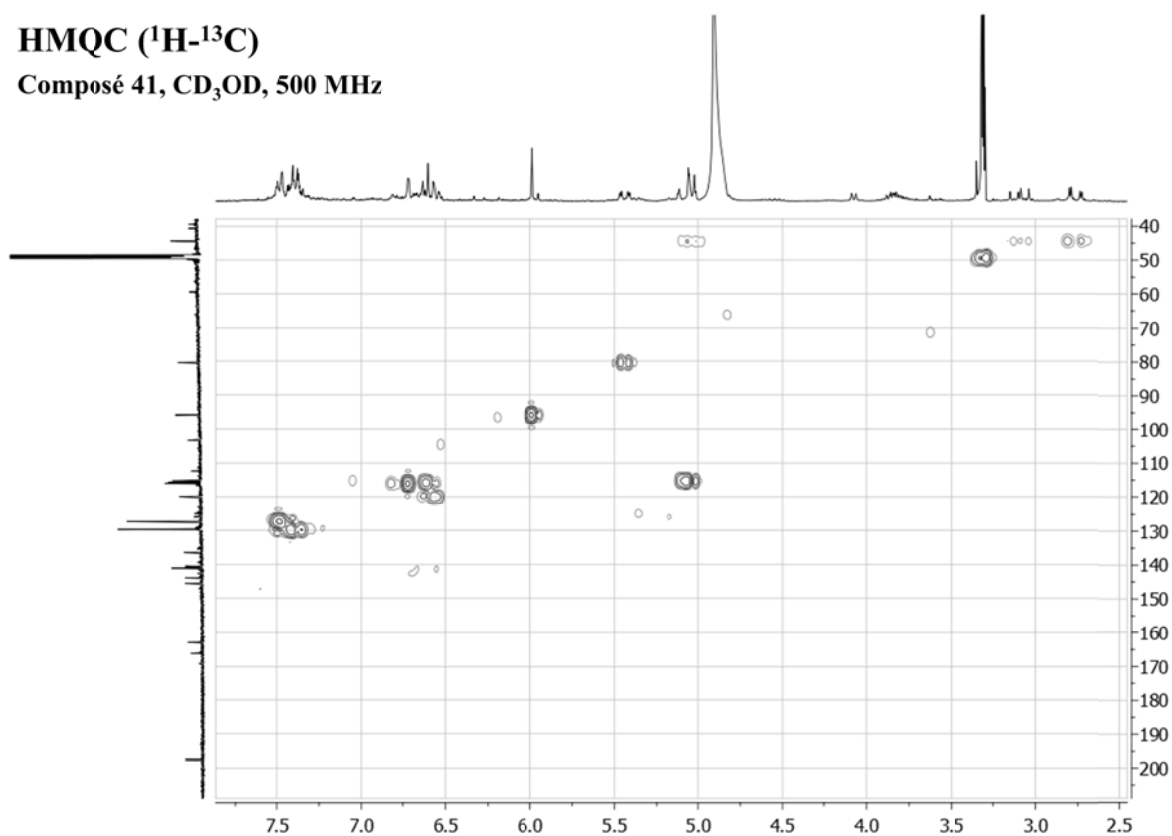
Composé 41, CD_3OD , 500 MHz

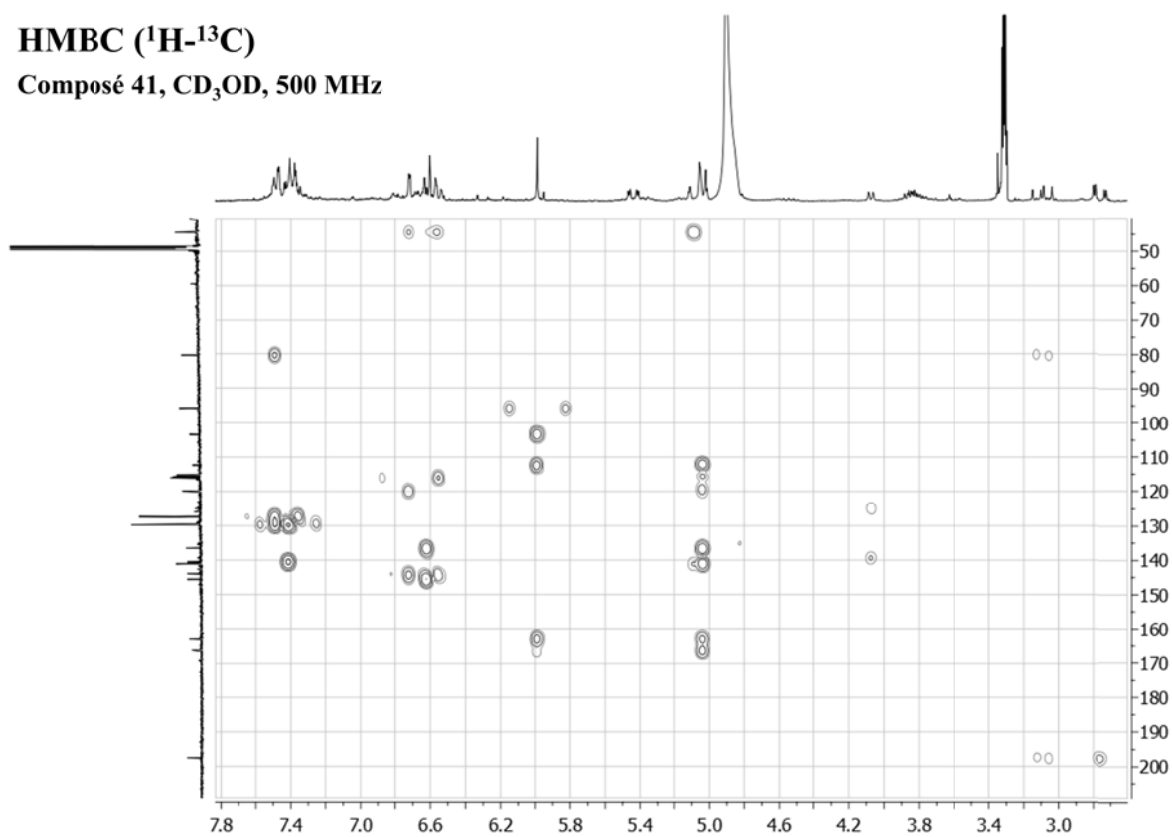
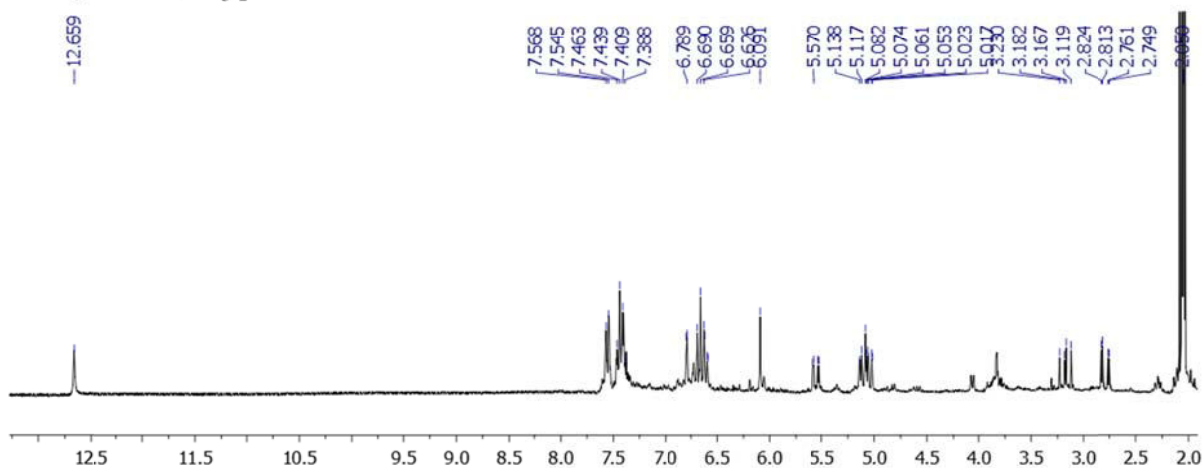


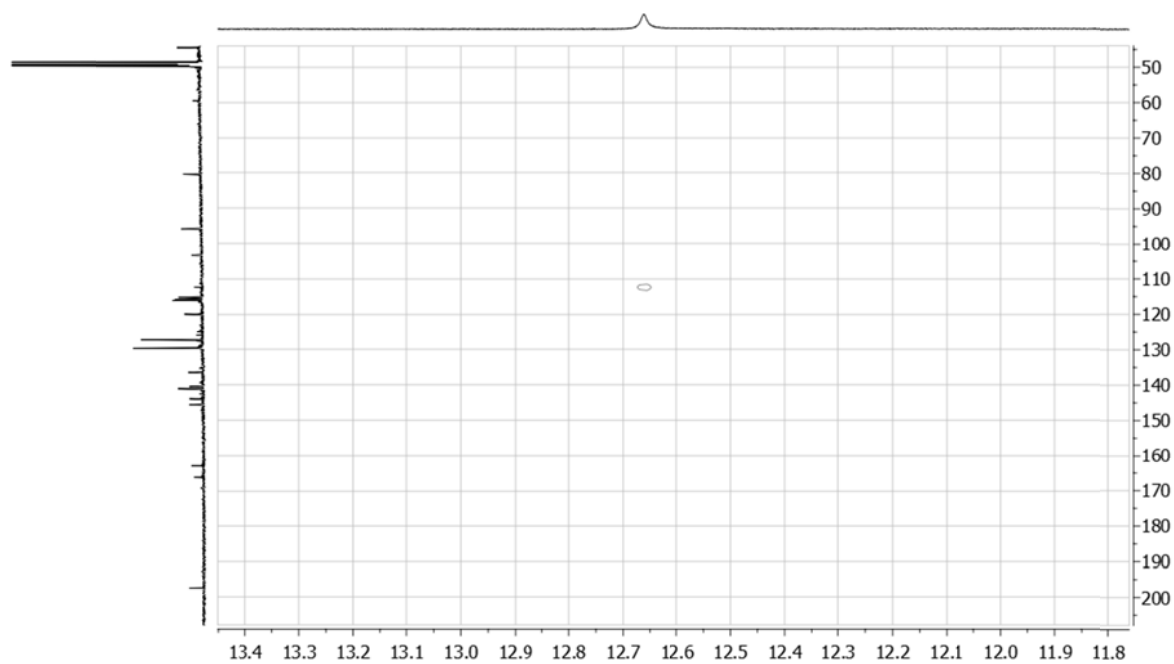
COSY (^1H - ^1H)

Composé 41, CD_3OD , 500 MHz



RMN ^{13}C Composé 41, CD_3OD , 500 MHzHMQC (^1H - ^{13}C)Composé 41, CD_3OD , 500 MHz

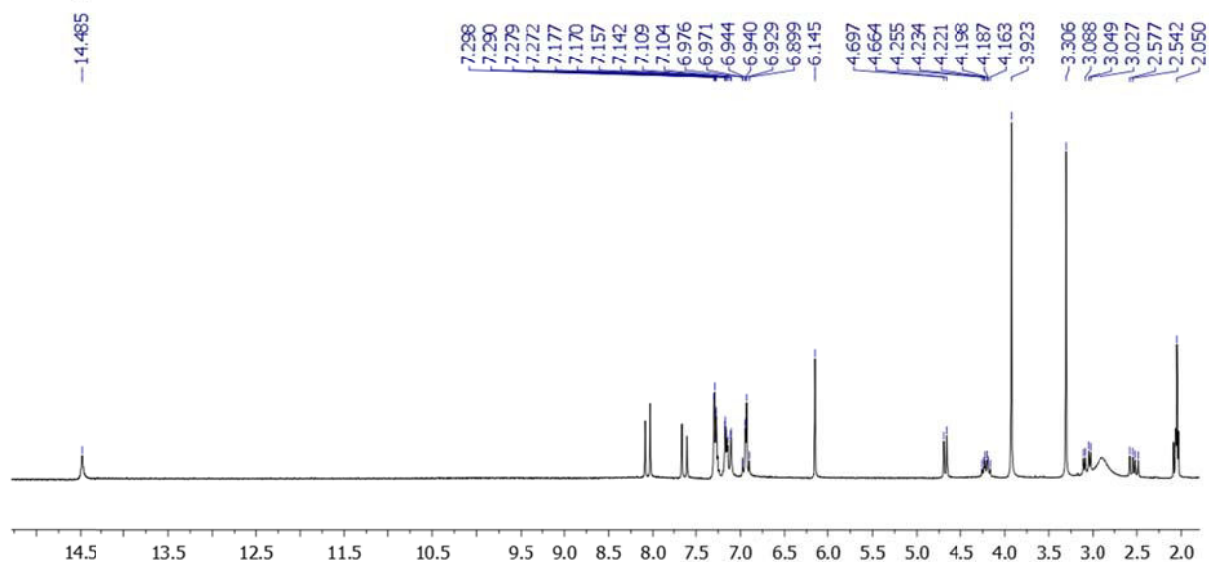
HMBC (^1H - ^{13}C)Composé 41, CD_3OD , 500 MHzRMN ^1H Composé 41, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

HMBC (^1H - ^{13}C)Composé 41, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

ANNEXE 5 : Spectres RMN de la 8-[(E)-phénylprop-2-èn-1-one]-5-méthoxycatéchine (43)

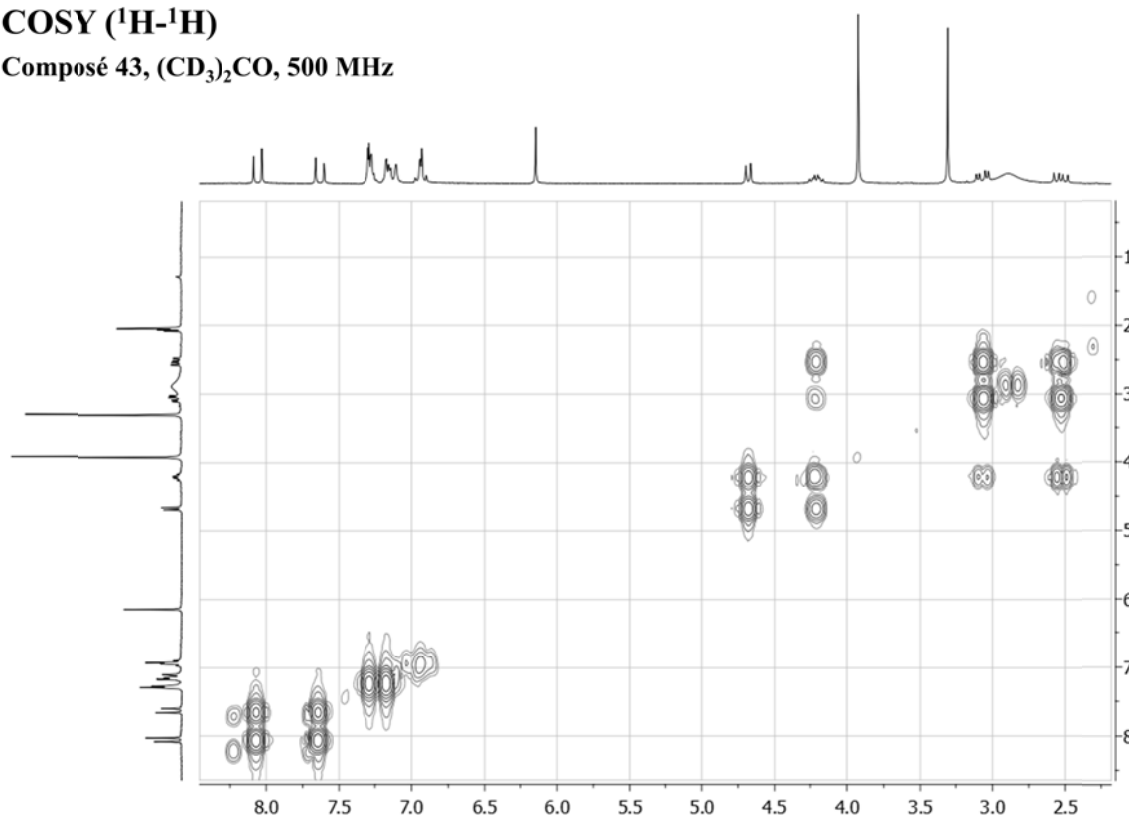
RMN ^1H

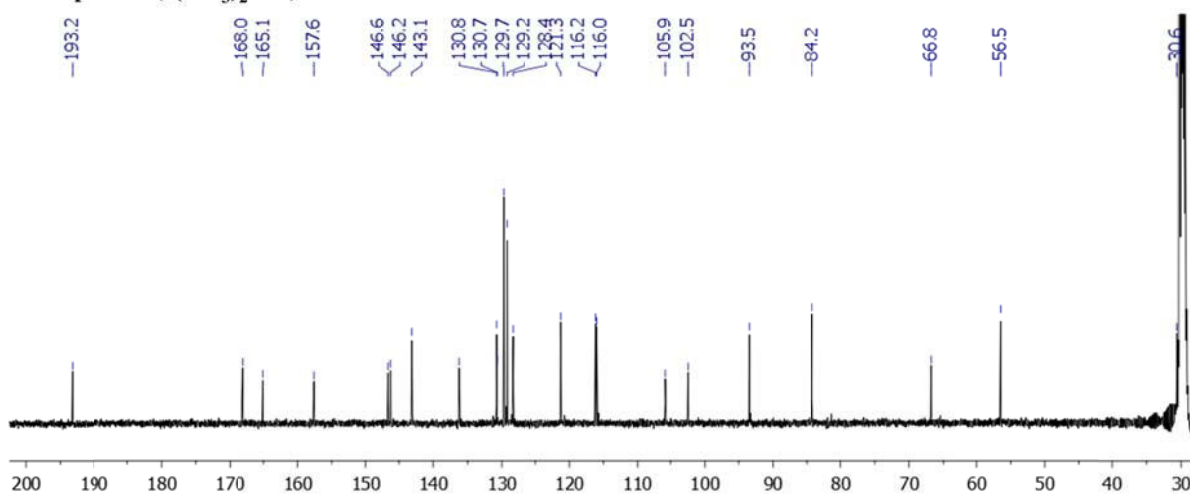
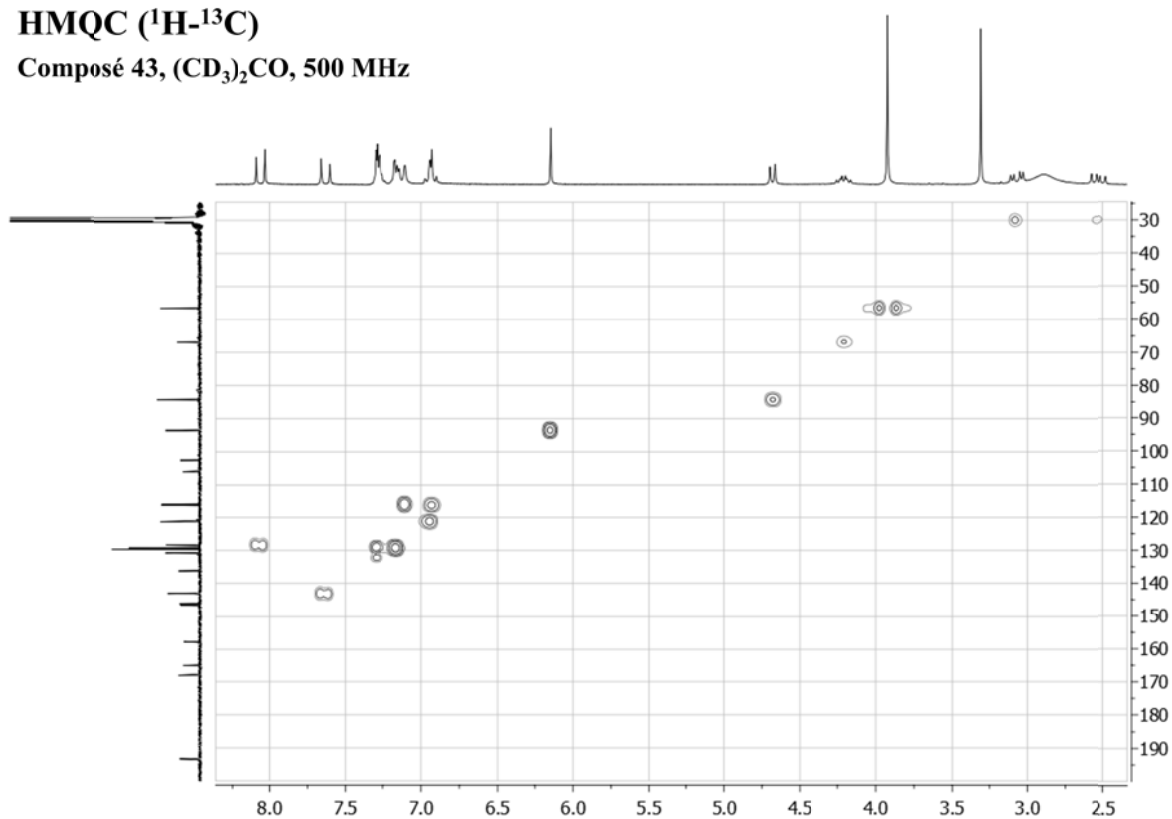
Composé 43, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

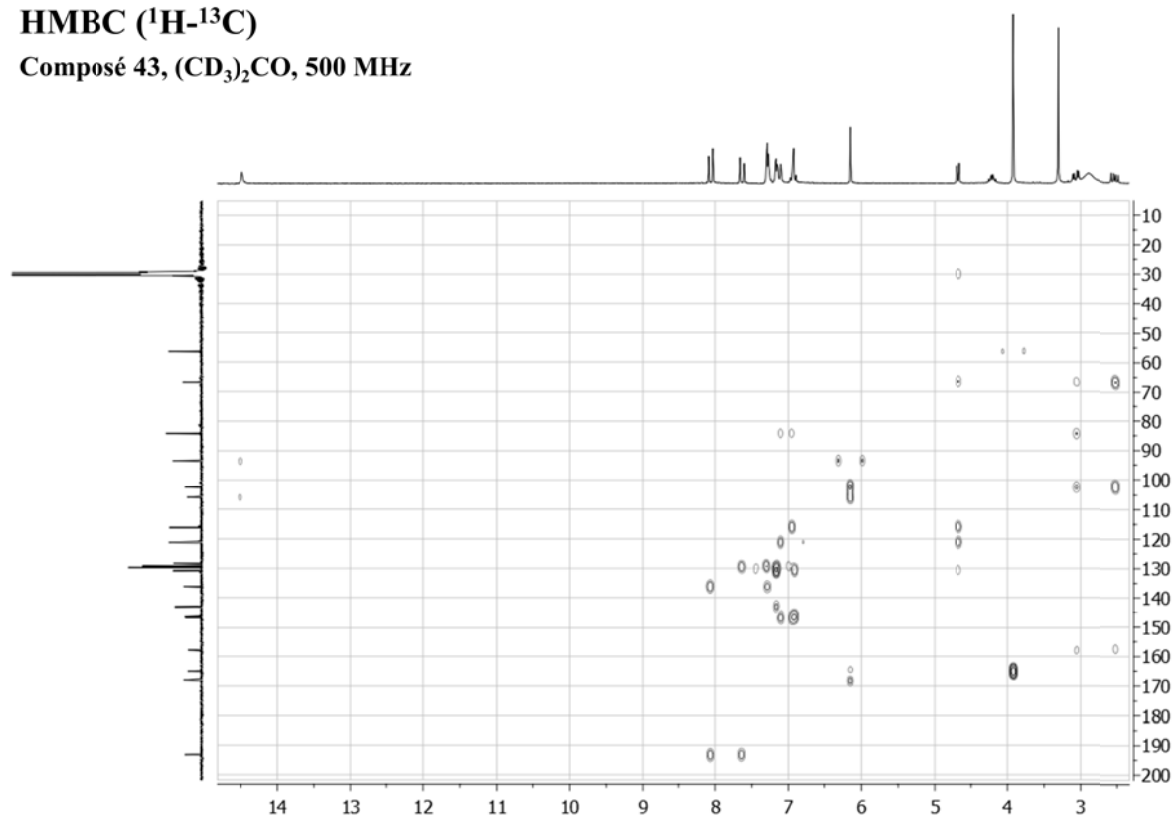
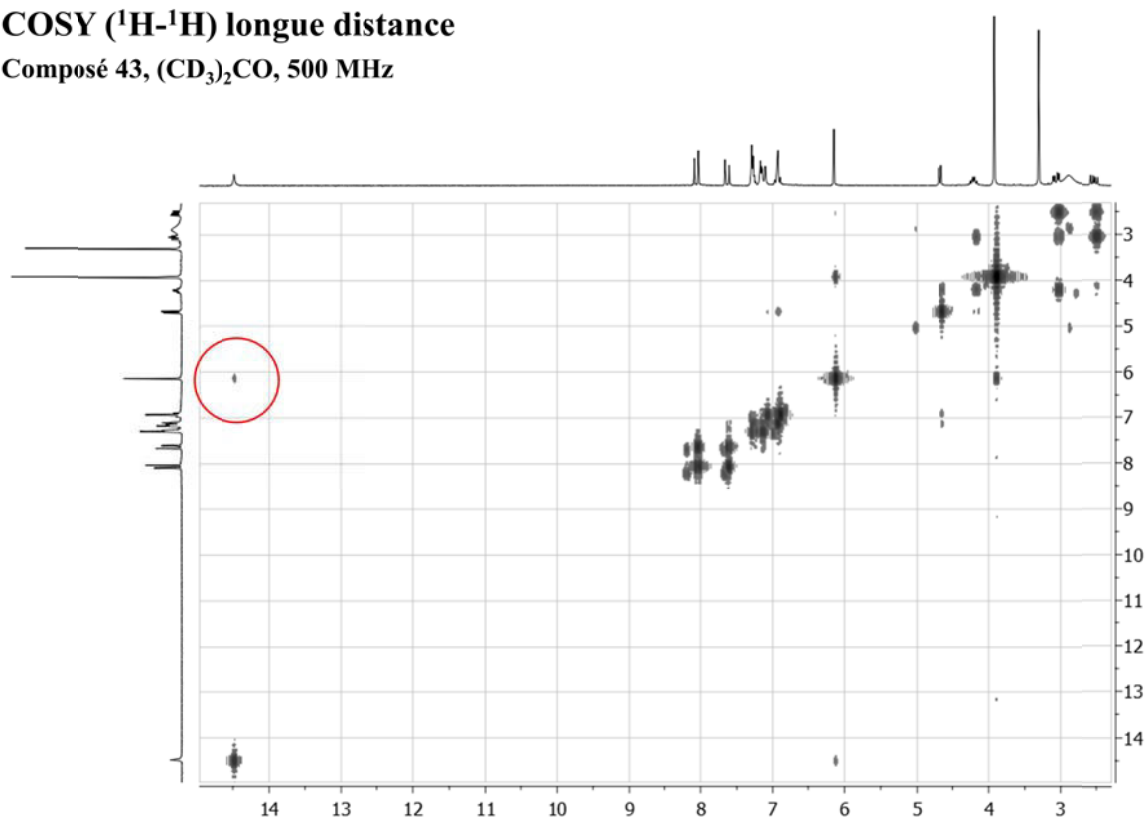


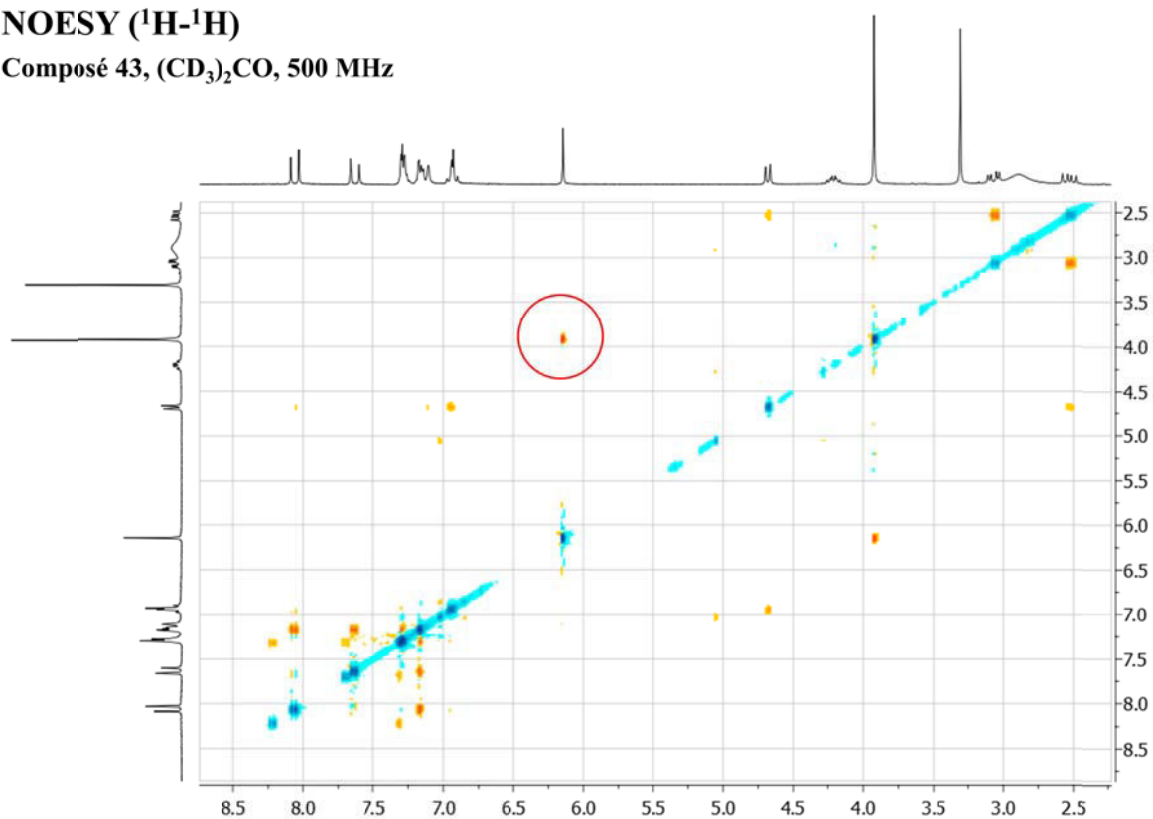
COSY (^1H - ^1H)

Composé 43, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz



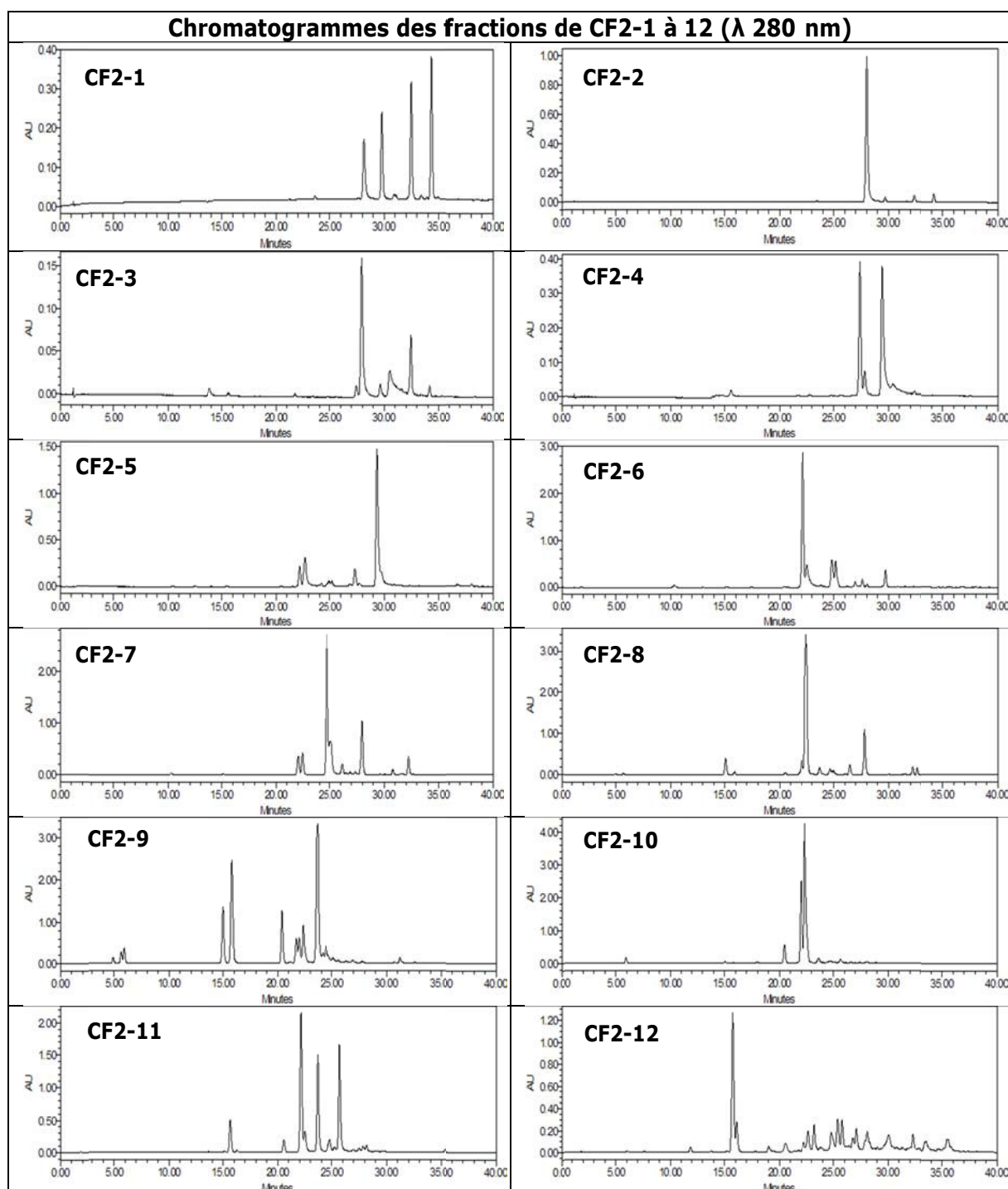
RMN ^{13}C Composé 43, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHzHMQC (^1H - ^{13}C)Composé 43, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

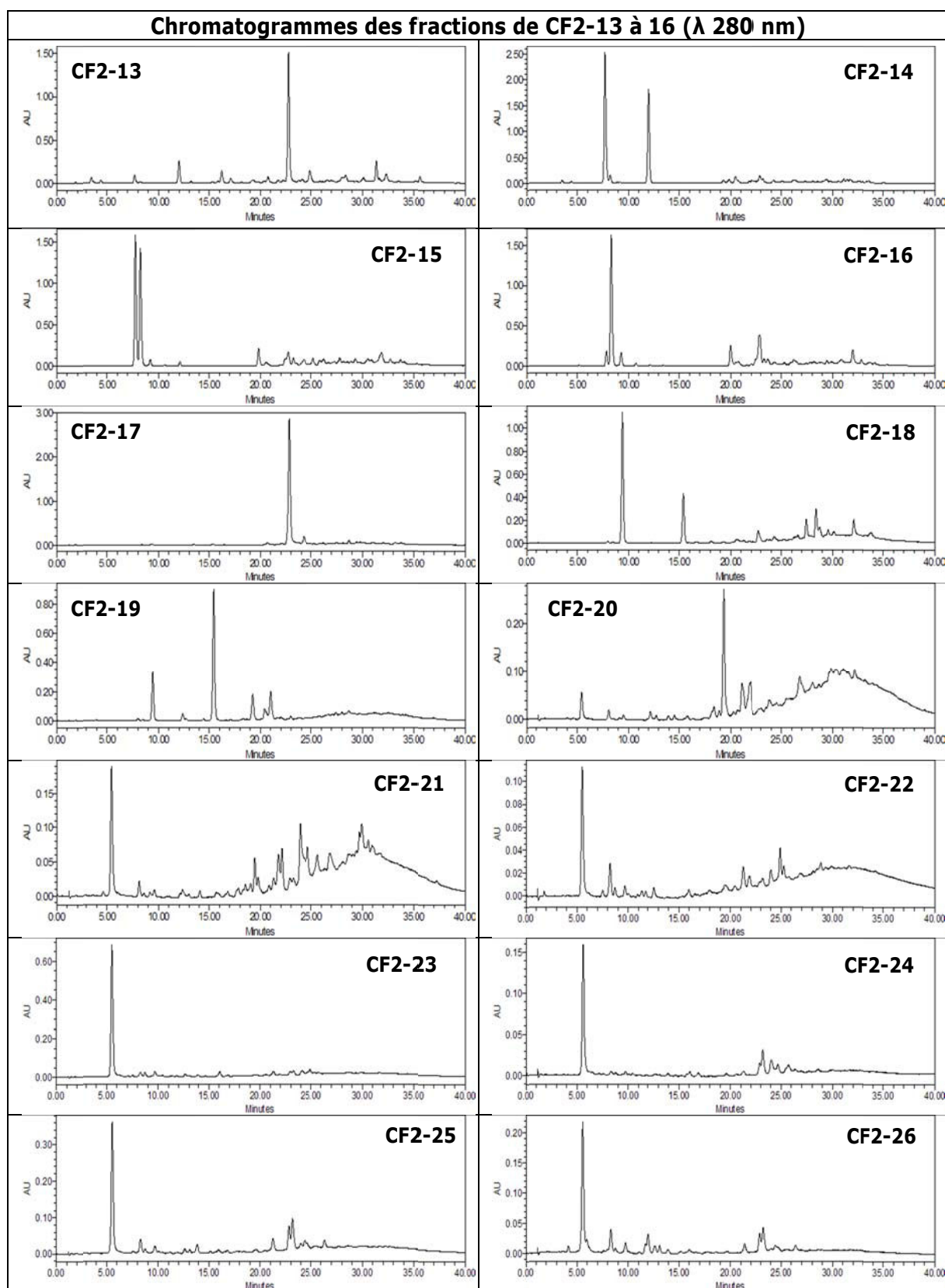
HMBC (^1H - ^{13}C)Composé 43, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz**COSY (^1H - ^1H) longue distance**Composé 43, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

NOESY (^1H - ^1H)Composé 43, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

ANNEXE 6 : Chromatogrammes HPLC des fractions CF2-1 à

26





ANNEXE 7 : Activités DPPH et anti-AGEs des extraits de propolis E01-08 et de 17 de ses constituants

Valeurs des activités antioxydantes DPPH et anti-AGEs des extraits de propolis E01-08 et de l'extrait EtOH de *S. Japonicum*

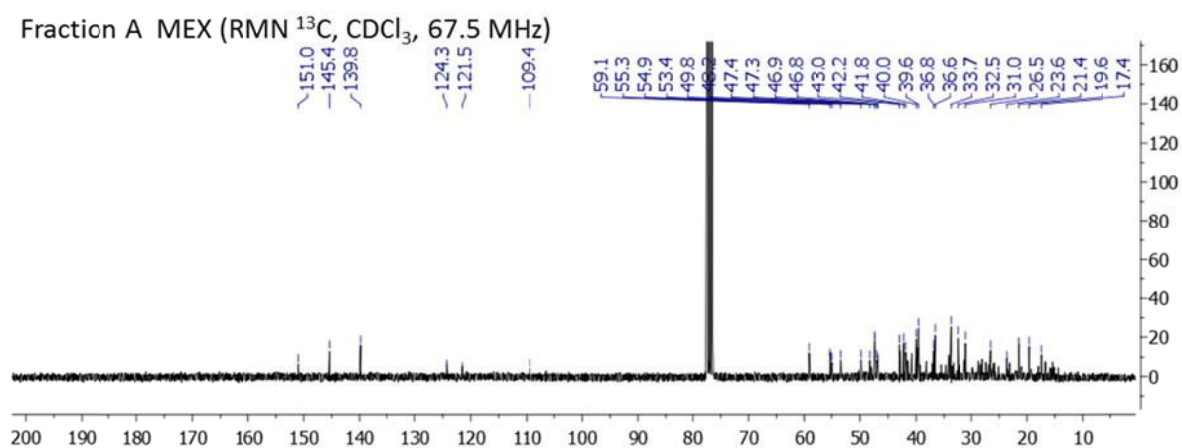
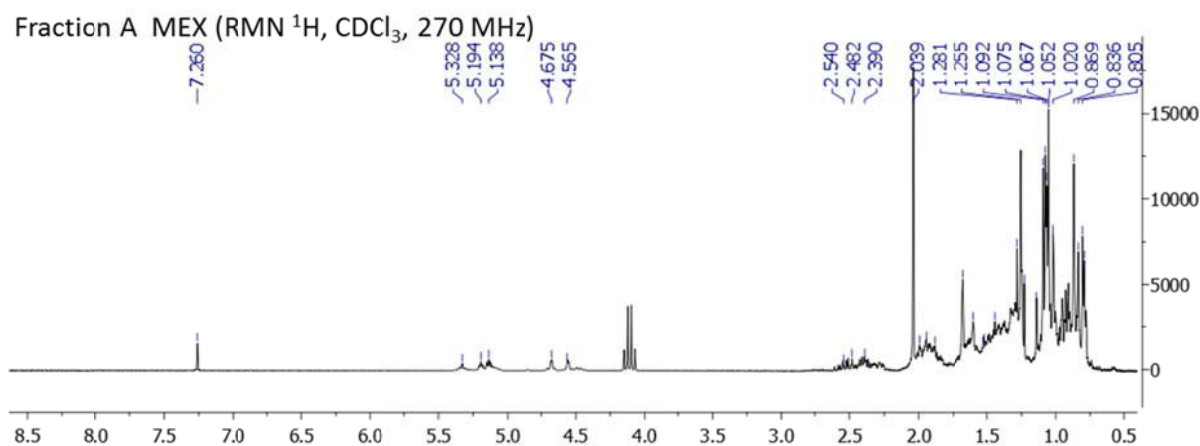
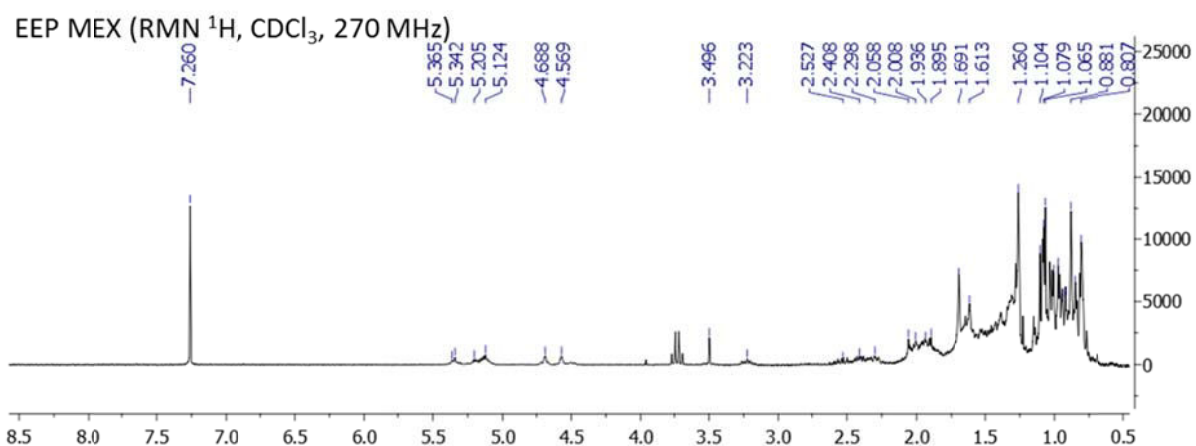
Extraits	DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)	Anti-AGEs (CI_{50} , mg/mL)	Composés majoritaires
E01 EtOH 70	1650 \pm 149	0.03	Esters phénoliques et flavonoïdes
E02 MeOH	1386 \pm 171	0.03	Esters phénoliques et flavonoïdes
E03 EtOH 95	1605 \pm 26	0.05	Esters phénoliques et flavonoïdes
E04-2 DCM	1437 \pm 105	0.03	Esters phénoliques et flavonoïdes
E05-1 Aq	1656 \pm 97	0.48	Acides phénoliques
E05-2 EtOH 90	1525 \pm 106	0.06	Esters phénoliques et flavonoïdes
E06-2 DCM	1022 \pm 9	0.04	Esters phénoliques et flavonoïdes
E07-2 Aq	1731 \pm 28	0.36	Acides phénoliques
E07-3 DCM	1162 \pm 103	0.03	Esters phénoliques et flavonoïdes
E08-2 mixte	1964 \pm 124	0.04	Esters phénoliques et flavonoïdes
<i>S. japonicum</i>	1714 \pm 68	0.09	Flavonoïdes (rutoside)

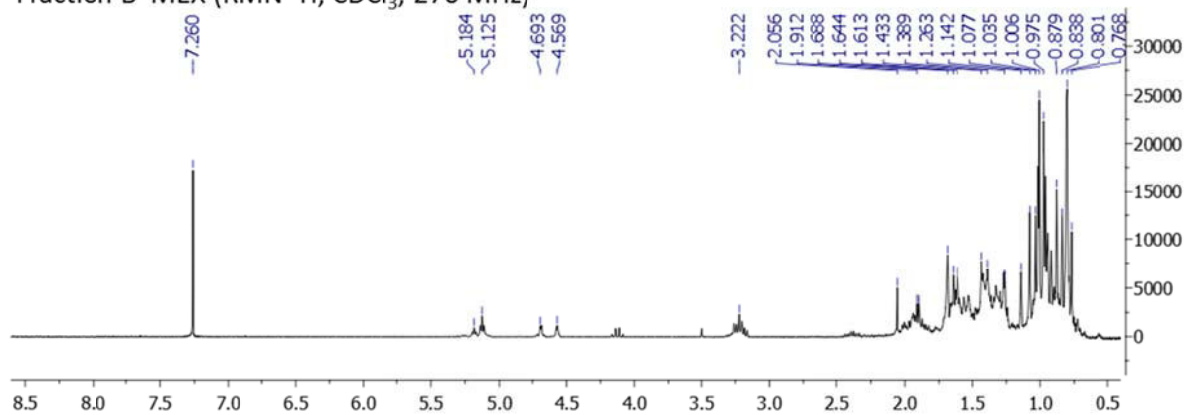
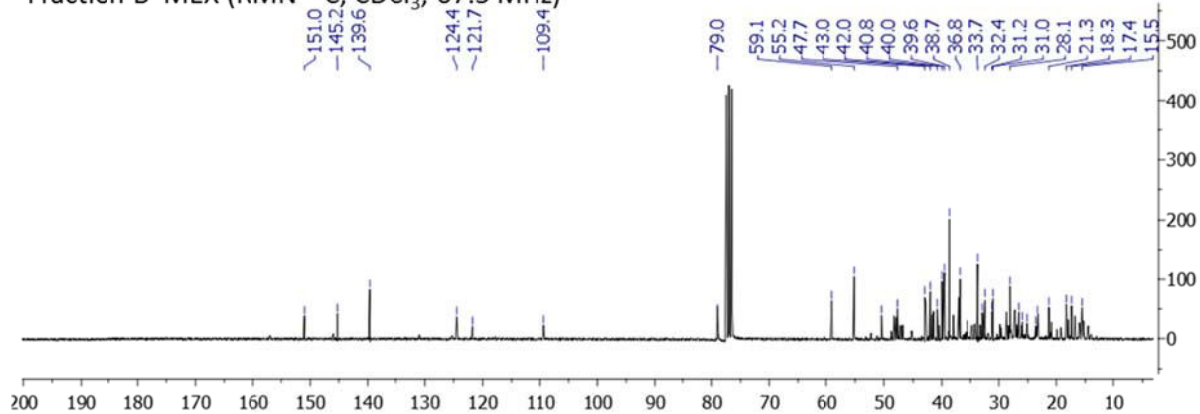
Valeurs des activités antioxydantes DPPH et anti-AGEs de 17 constituants de la propolis de BFA

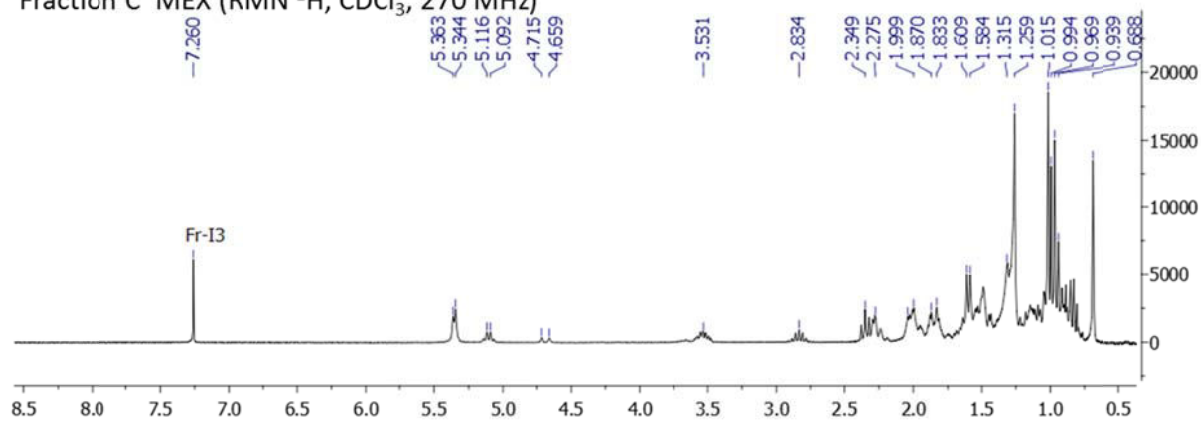
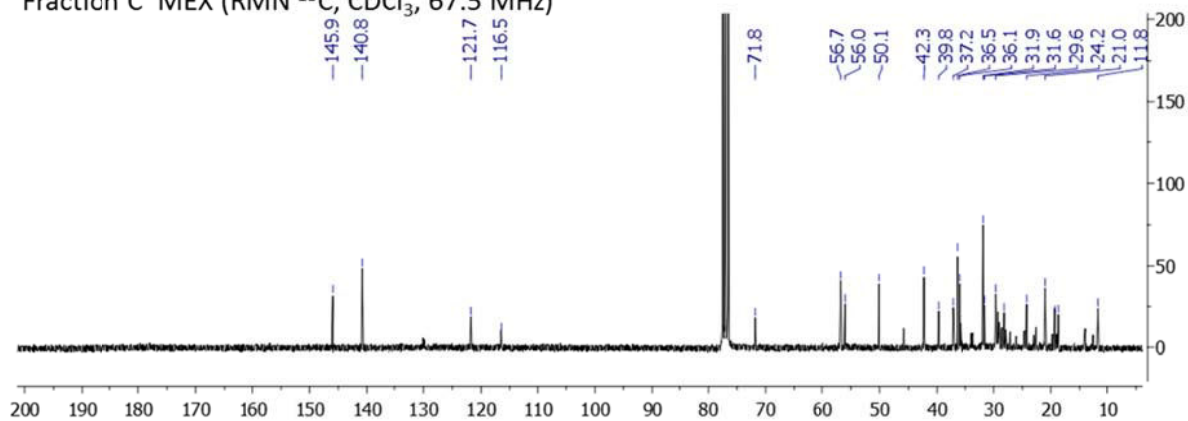
Composés	DPPH ($\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$)	Anti-AGEs (IC_{50} , mM)
Acide caféique (4)	1.00	0.9
Acide <i>p</i> -coumarique (7)	NA	3
Acide férulique (8)	0.59	0.7
Acide isoférulique (9)	NA	0.9
Acide 3,4-diméthoxycinnamique (11)	NA	0.3
Naringénine (16)	NA	0.2
Pinobanksine (17)	NA	0.08
Quercétine (18)	2.03	0.2
pinocembrine (26)	NA	0.3
Caféate de benzyle (27)	1.17	0.4
Pinobanksine-3-acétate (29)	NA	0.06
Caféate de prényle (30)	1.22	0.09
2-acétyl-1,3-dicoumaroylglycérol (31)	0.36	0.07
CAPE (33)	1.46	1.6
Chrysin (34)	NA	3
<i>p</i> -coumarate de benzyle (35)	0.19	0.3
Dérivé de la catéchine (43)	1.21	0.8

NA : Non Actif

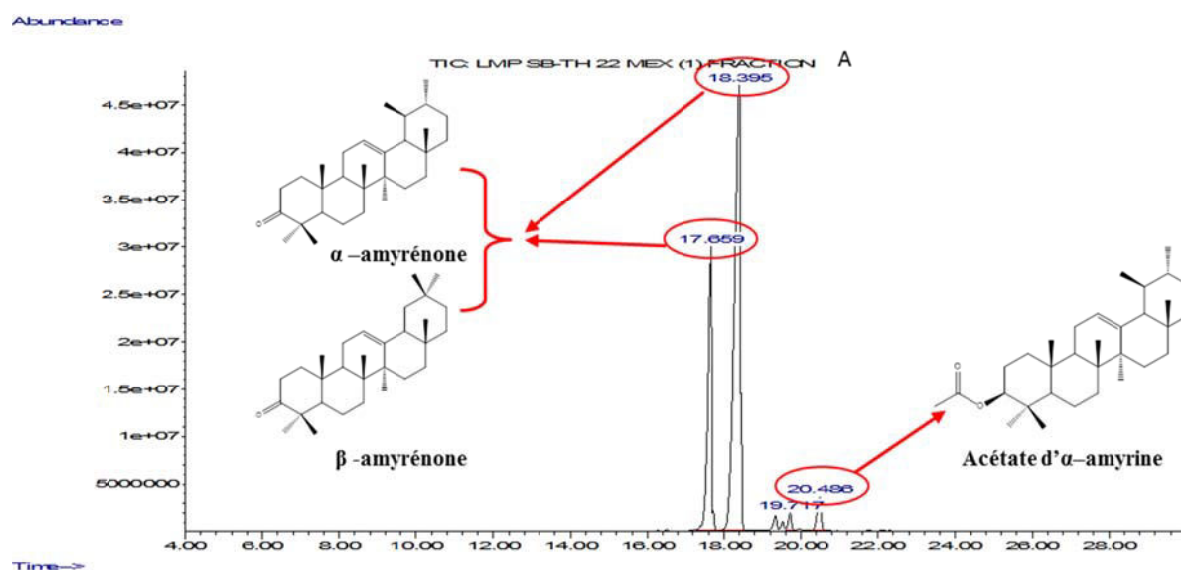
ANNEXE 8 : Spectres RMN (Propolis Mexicaine, MEX)



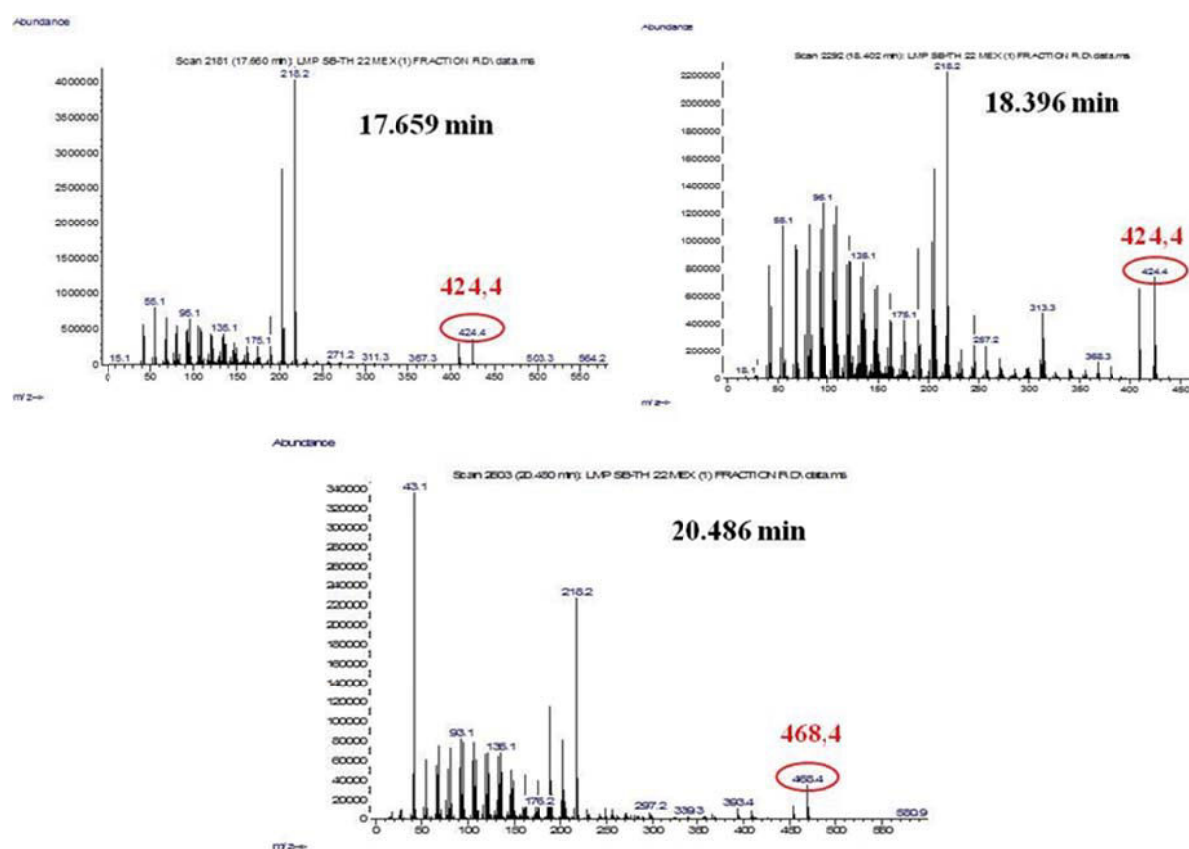
Fraction B MEX (RMN ^1H , CDCl_3 , 270 MHz)Fraction B MEX (RMN ^{13}C , CDCl_3 , 67.5 MHz)

Fraction C MEX (RMN ^1H , CDCl_3 , 270 MHz)Fraction C MEX (RMN ^{13}C , CDCl_3 , 67.5 MHz)

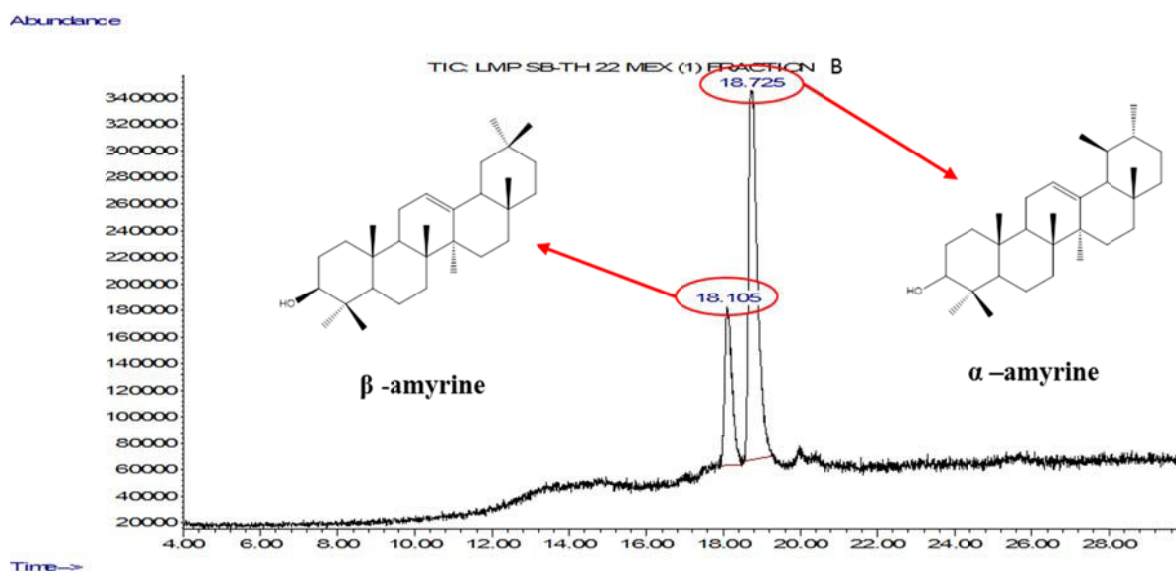
ANNEXE 9 : Analyse GC/MS (Propolis Mexicaine, MEX)



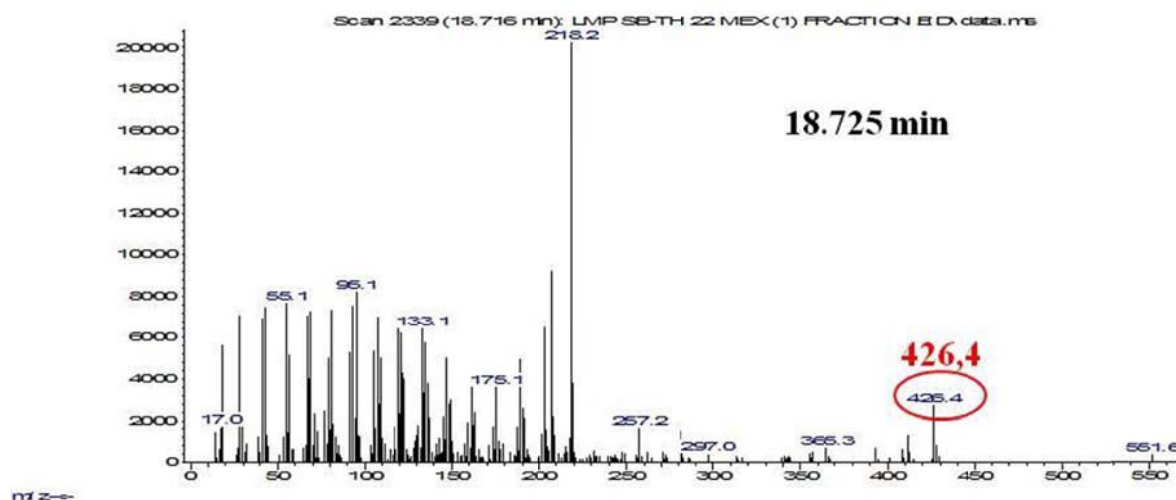
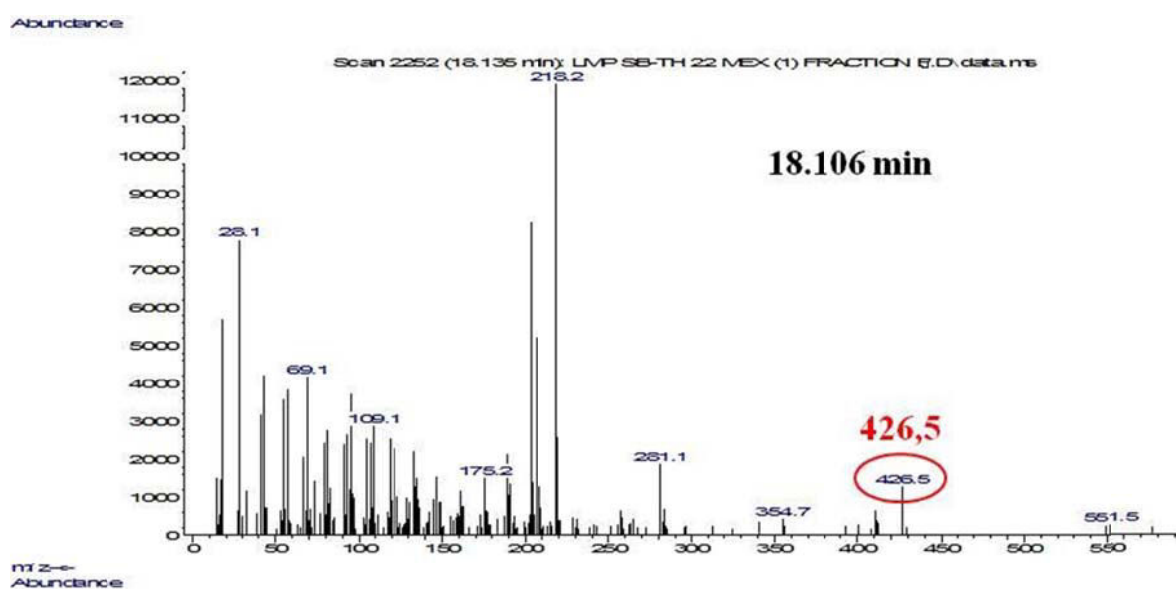
Chromatogramme GC (TIC) de la fraction A (MEX)



Spectres MS des composés majoritaires de la fraction A (MEX)

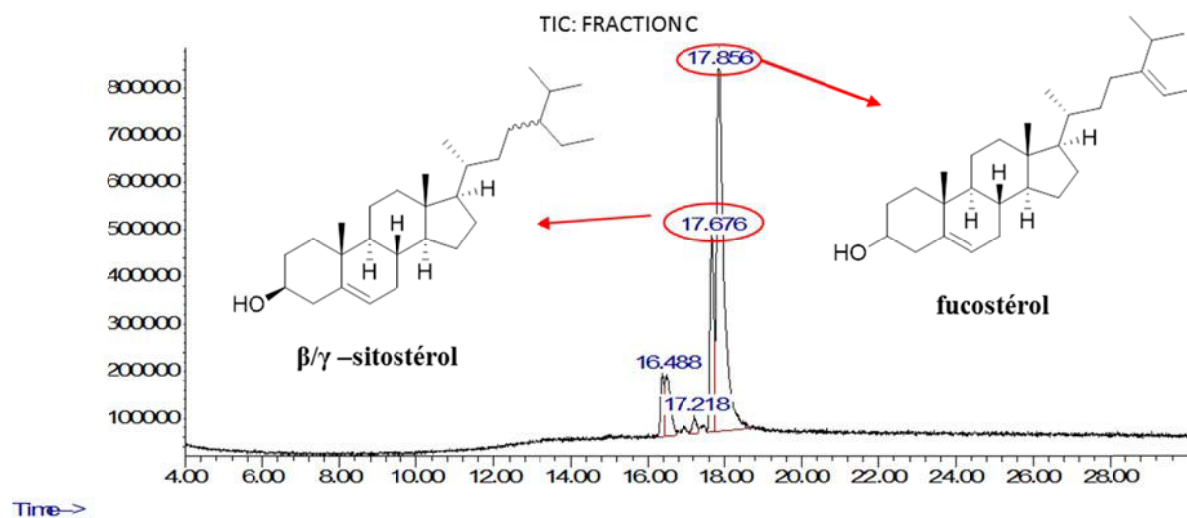


Chromatogramme GC (TIC) de la fraction B (MEX)



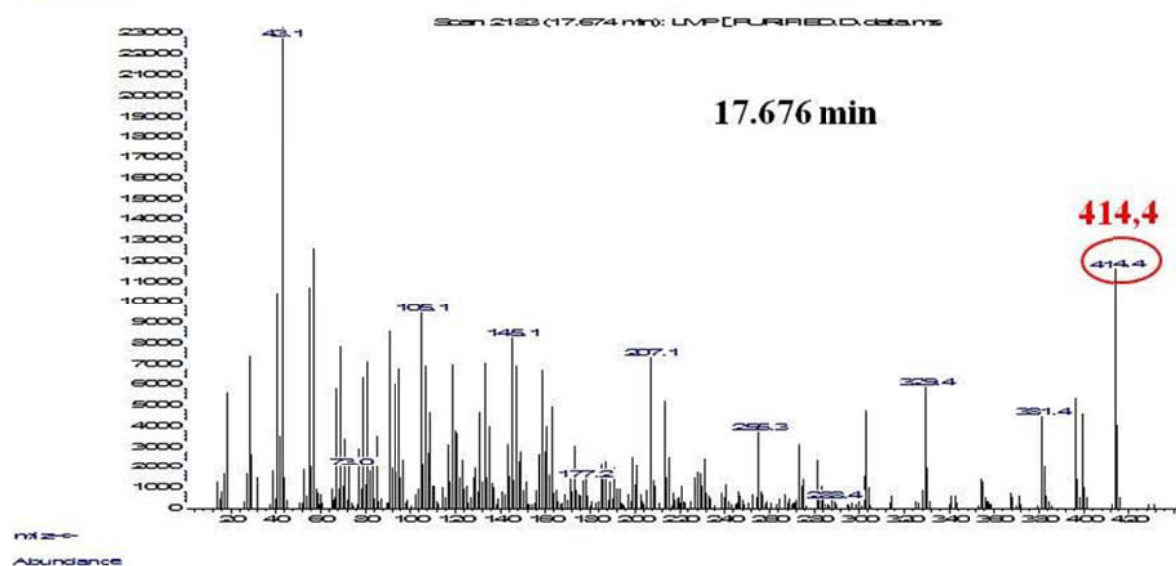
Spectres MS des composés majoritaires de la fraction B (MEX)

Abundance

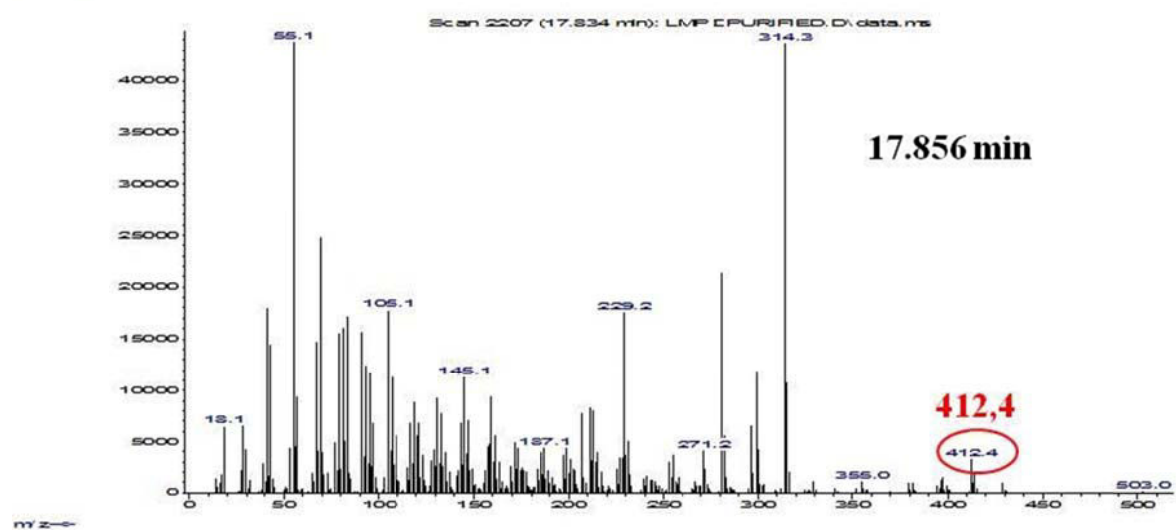


Chromatogramme GC (TIC) de la fraction C (MEX)

Abundance

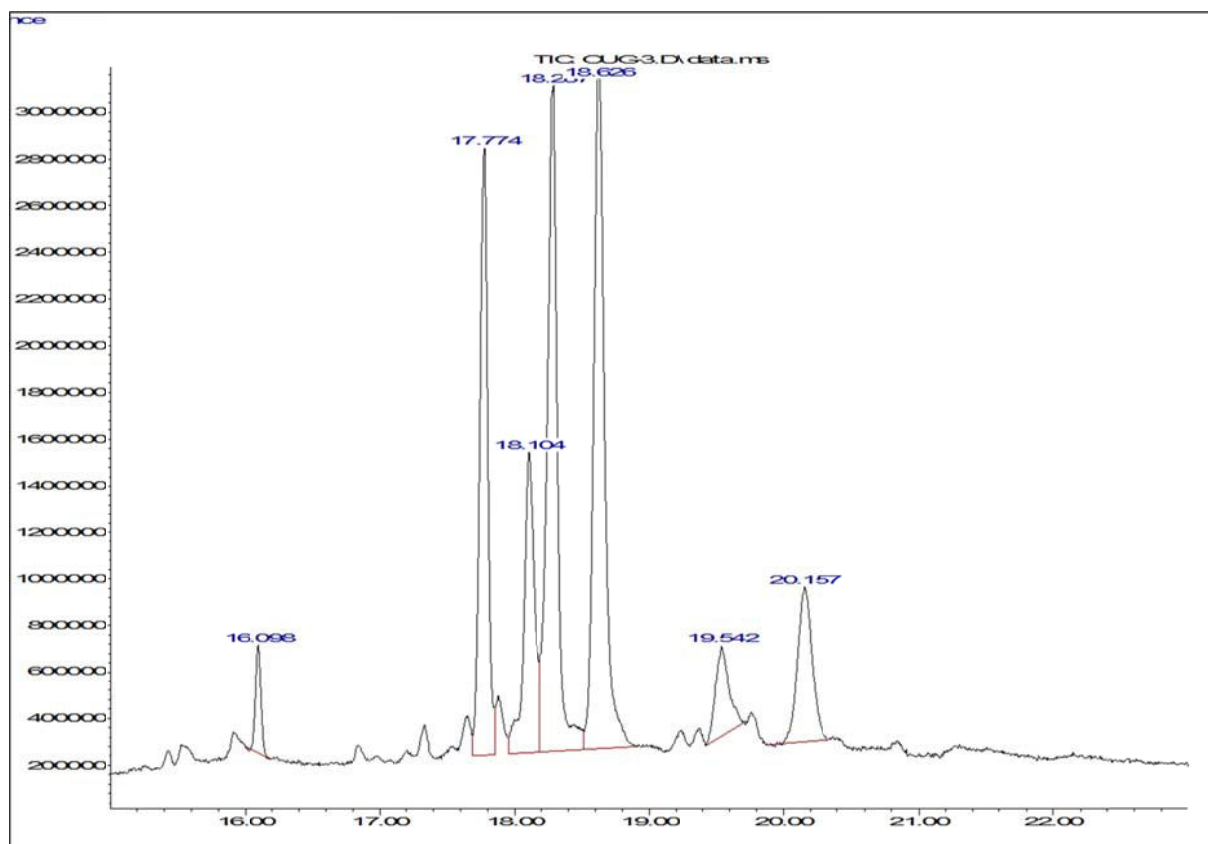


Abundance

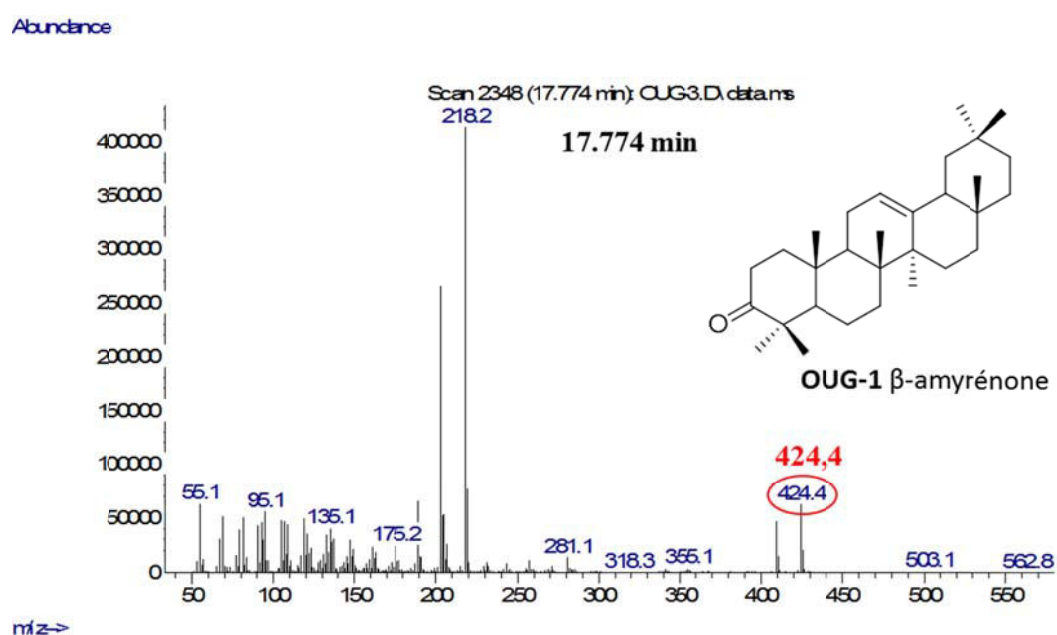


Spectres MS des composés majoritaires de la fraction C (MEX)

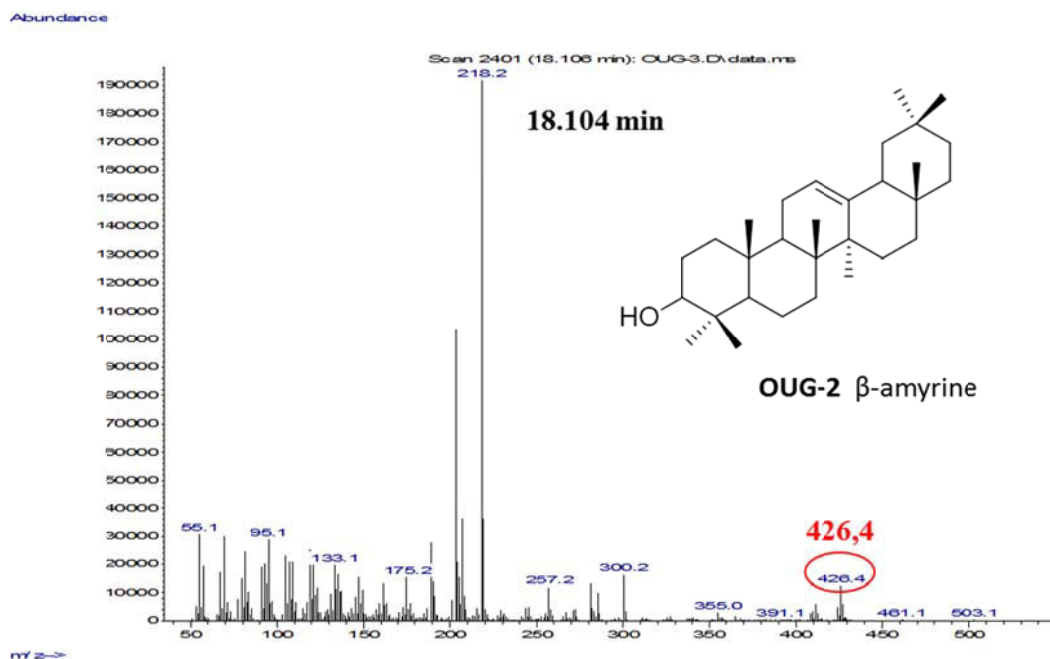
ANNEXE 10 : Analyse GC/MS (Propolis Ougandaise, OUG)



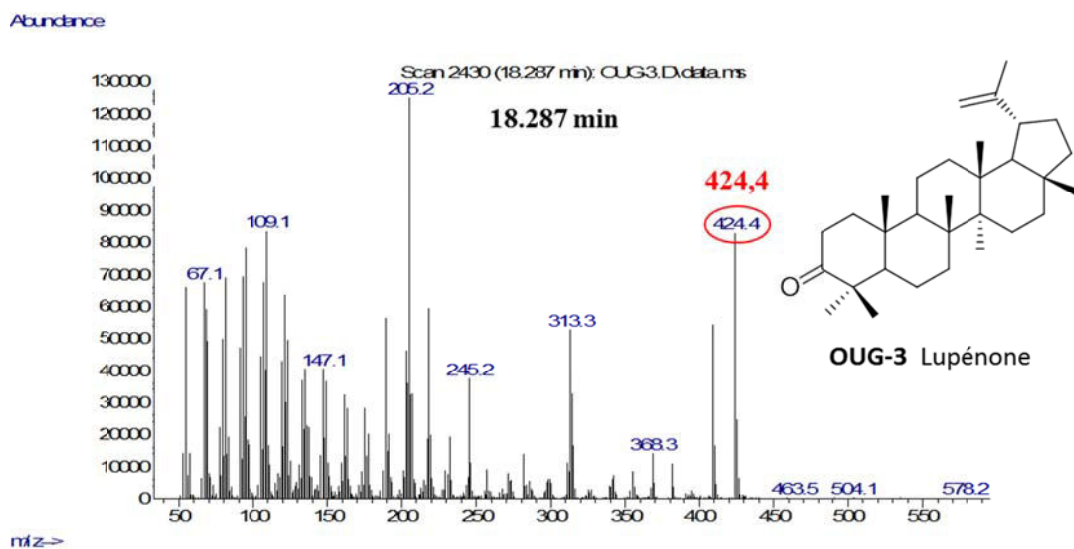
Chromatogramme GC (TIC) de l'extrait OUG-DCM



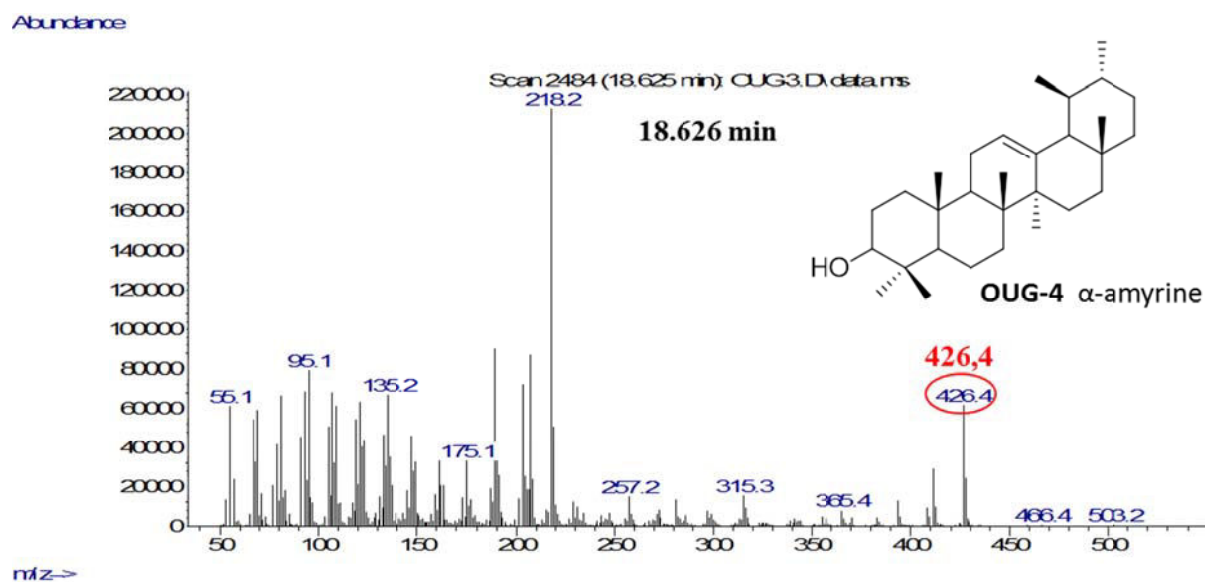
Spectre MS du composé à tr 17,774 min (OUG-1)



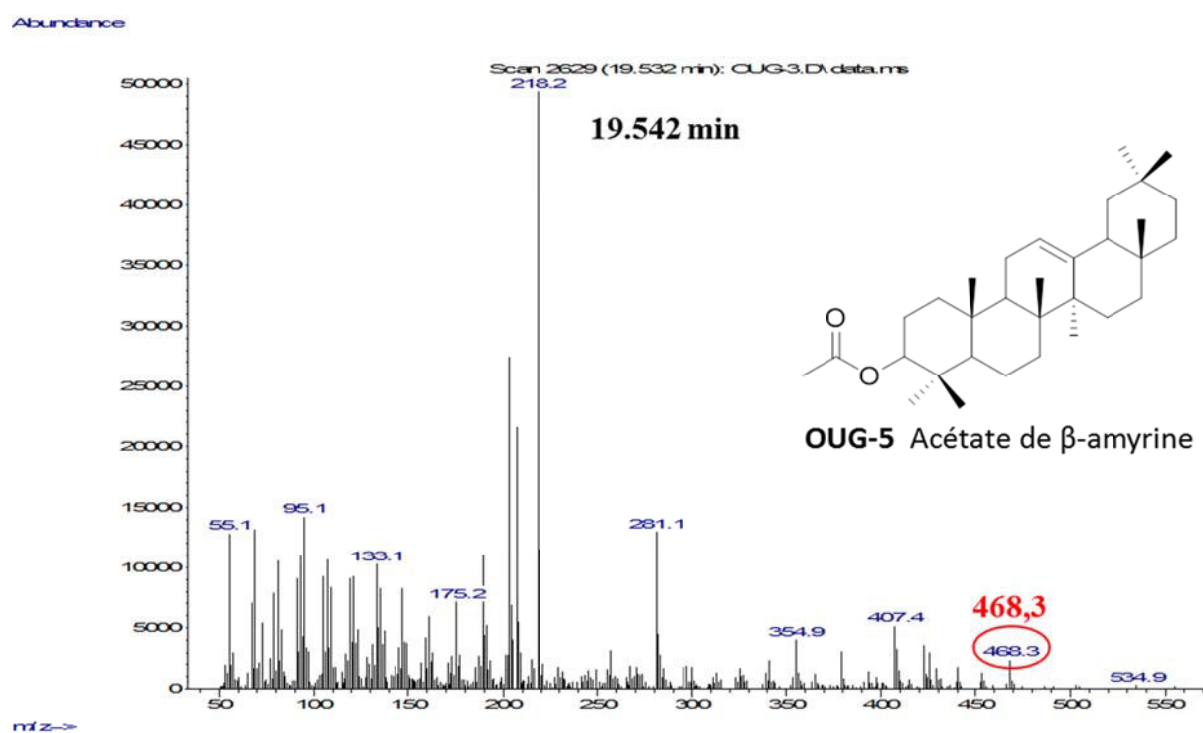
Spectre MS du composé à tr 18.104 min (OUG-2)



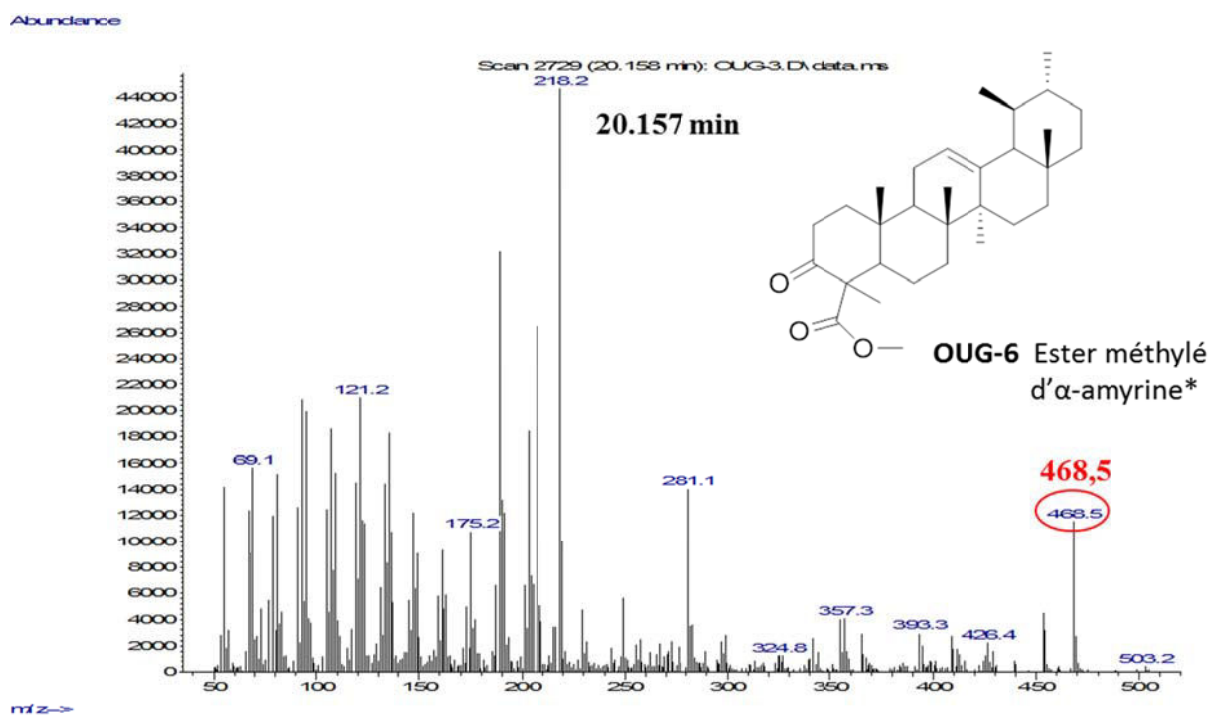
Spectre MS du composé à tr 18.287 min (OUG-3)



Spectre MS du composé à tr 18.626 min (OUG-4)



Spectre MS du composé à tr 19.542 min (OUG-5)

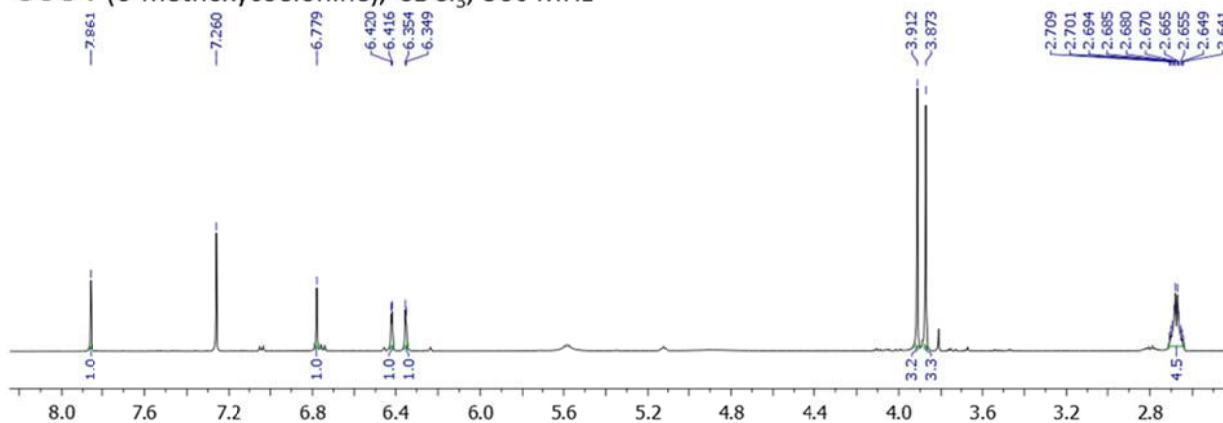


Spectre MS du composé à tr 20.157 min (OUG-6) (*d'après librairie NIST : Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester)

ANNEXE 11 : Spectres RMN de la 6-méthoxycoelonine (OUG-7)

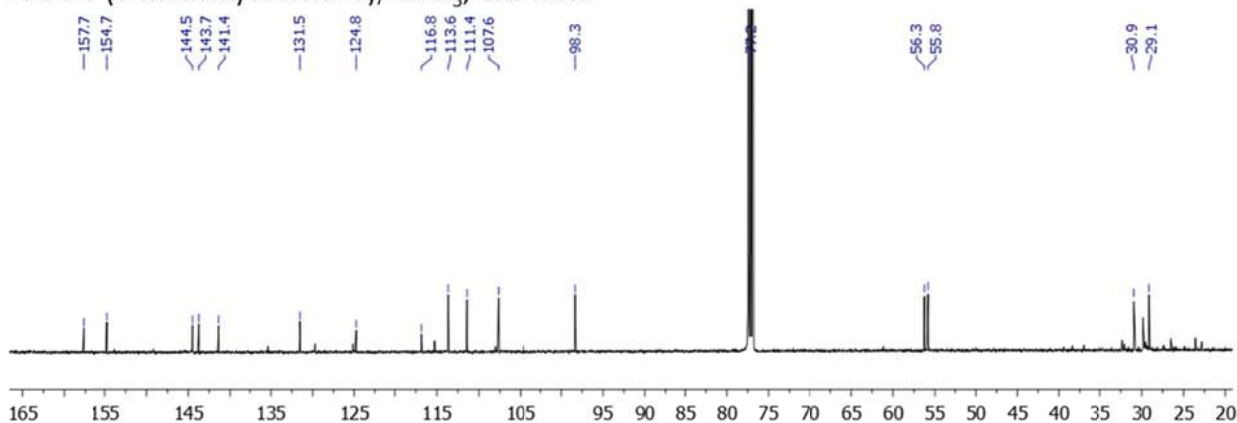
RMN ¹H

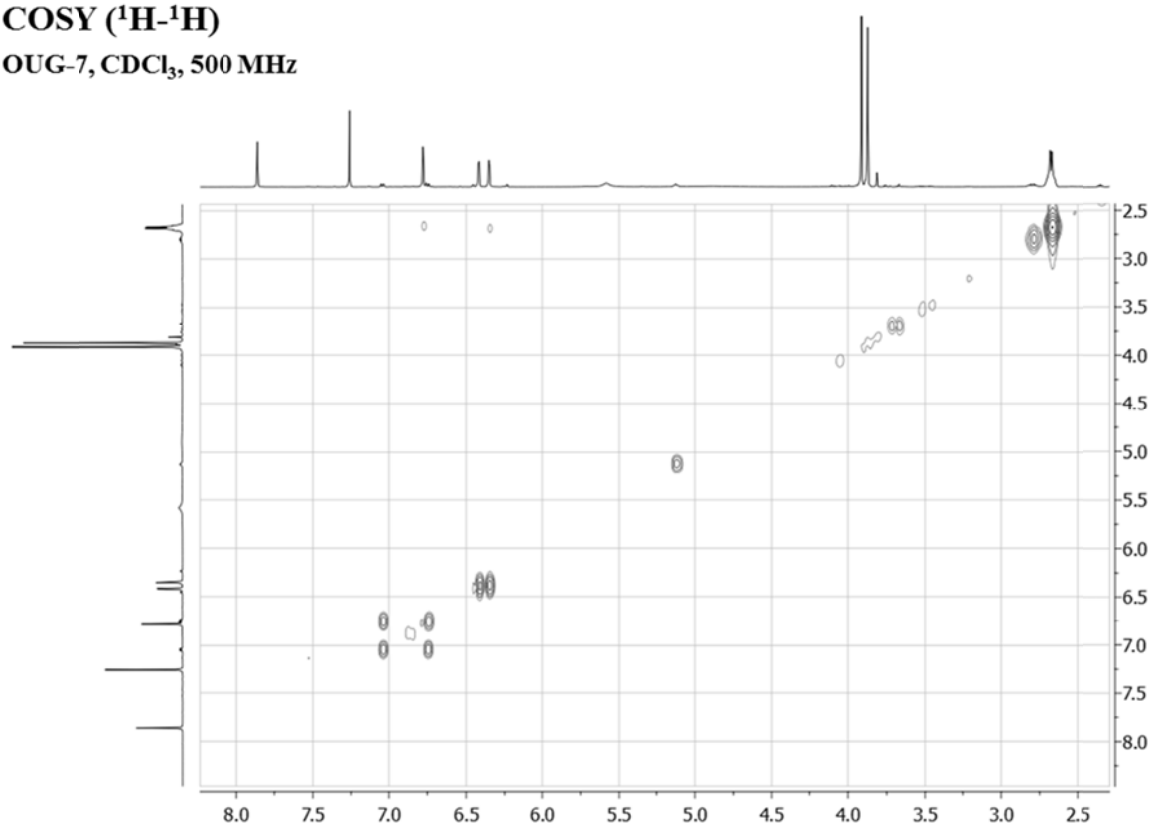
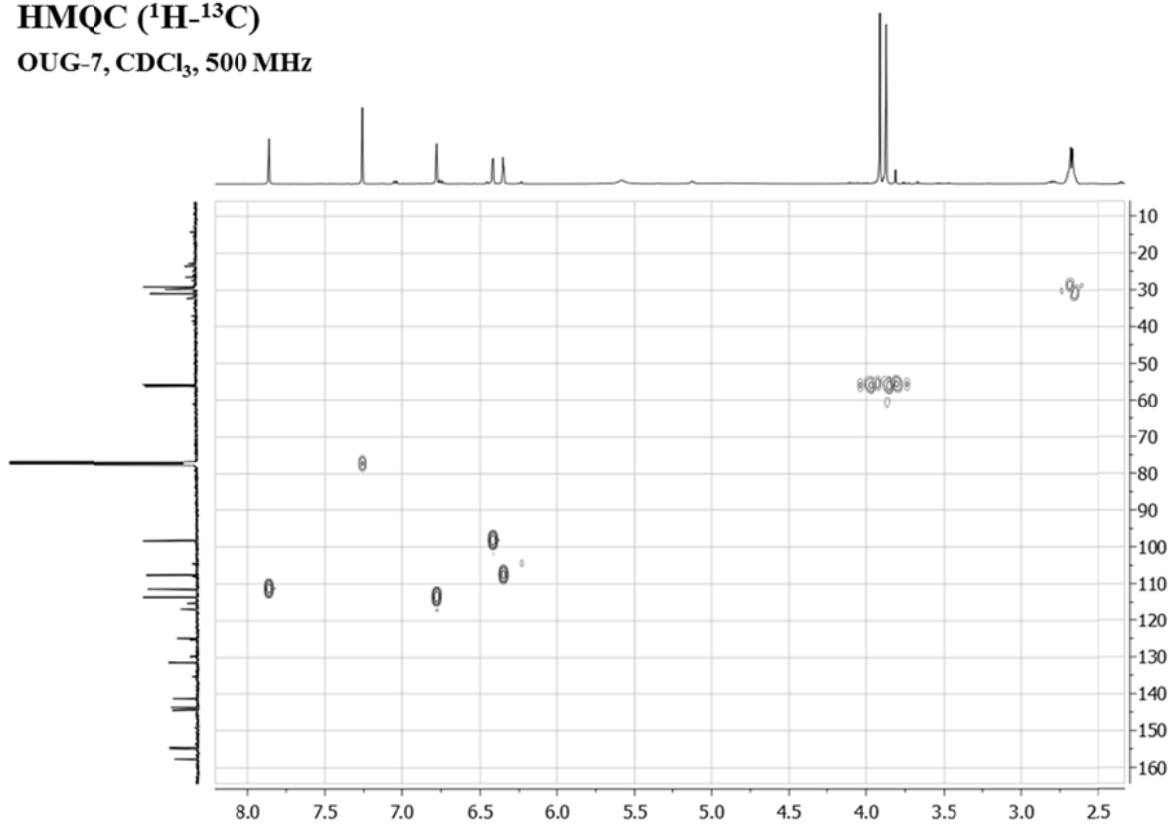
OUG-7 (6-méthoxycoelonine), CDCl₃, 500 MHz

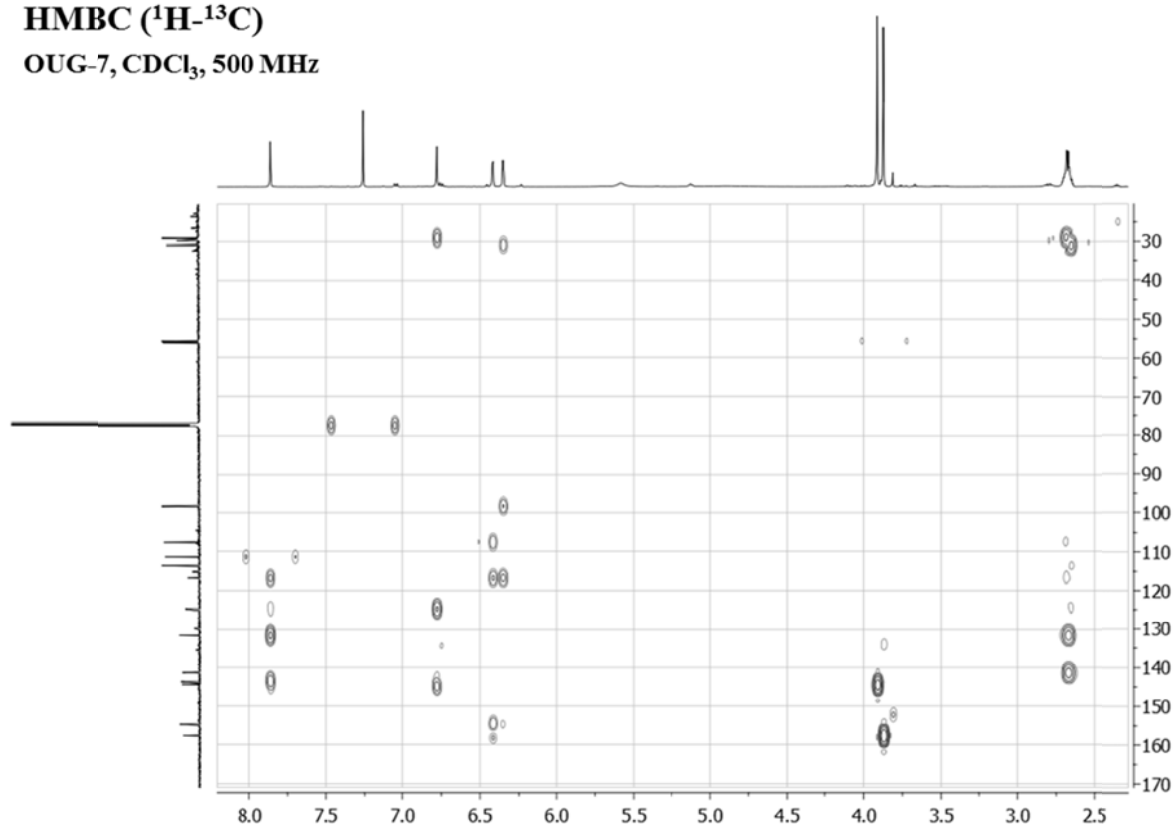
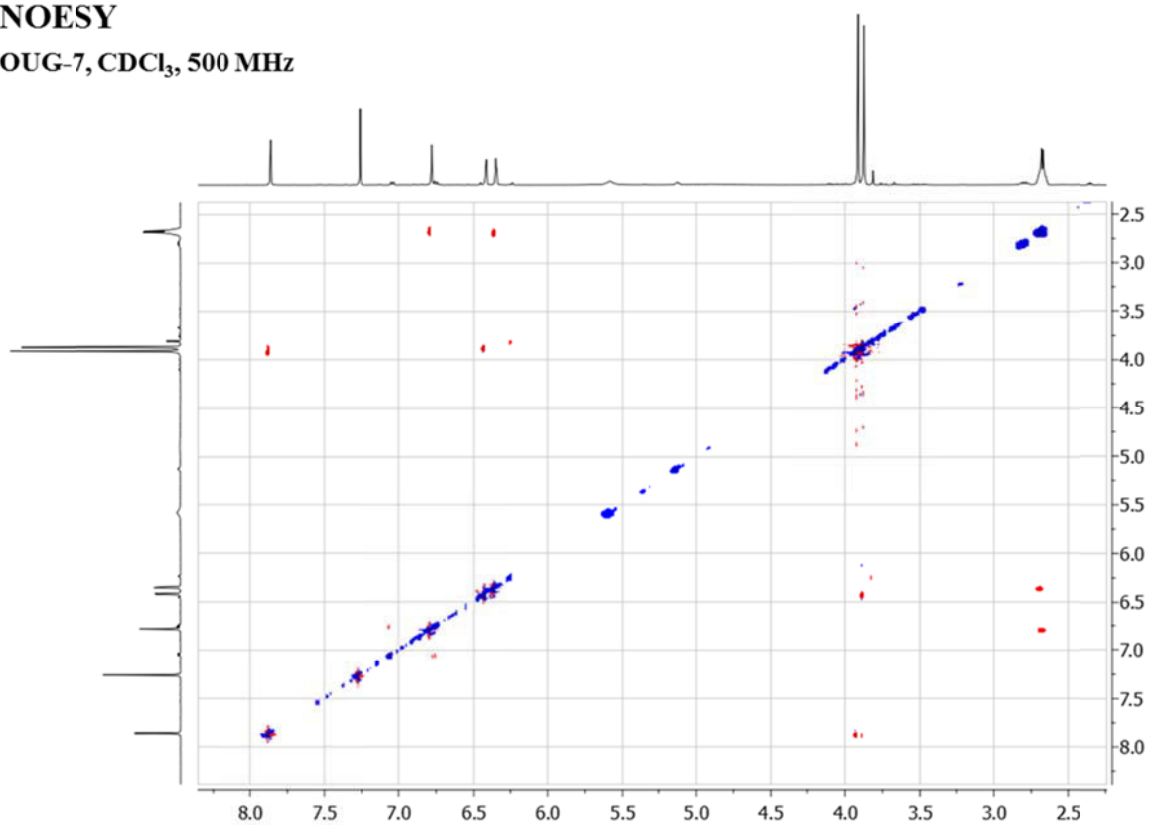


RMN ¹³C

OUG-7 (6-méthoxycoelonine), CDCl₃, 125 MHz



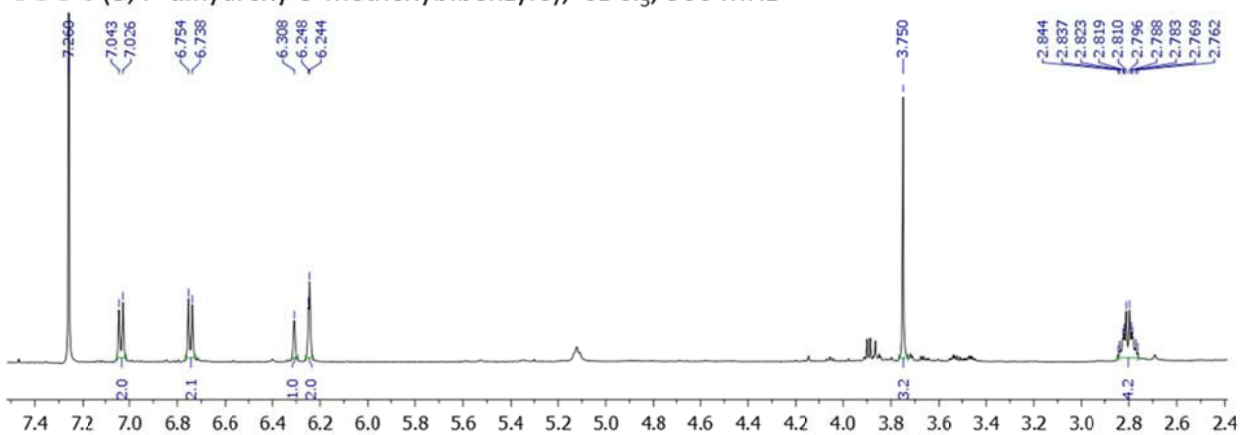
COSY (^1H - ^1H)OUG-7, CDCl_3 , 500 MHz**HMQC (^1H - ^{13}C)**OUG-7, CDCl_3 , 500 MHz

HMBC (^1H - ^{13}C)OUG-7, CDCl_3 , 500 MHz**NOESY**OUG-7, CDCl_3 , 500 MHz

ANNEXE 12 : Spectres RMN du 3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle (OUG-8)

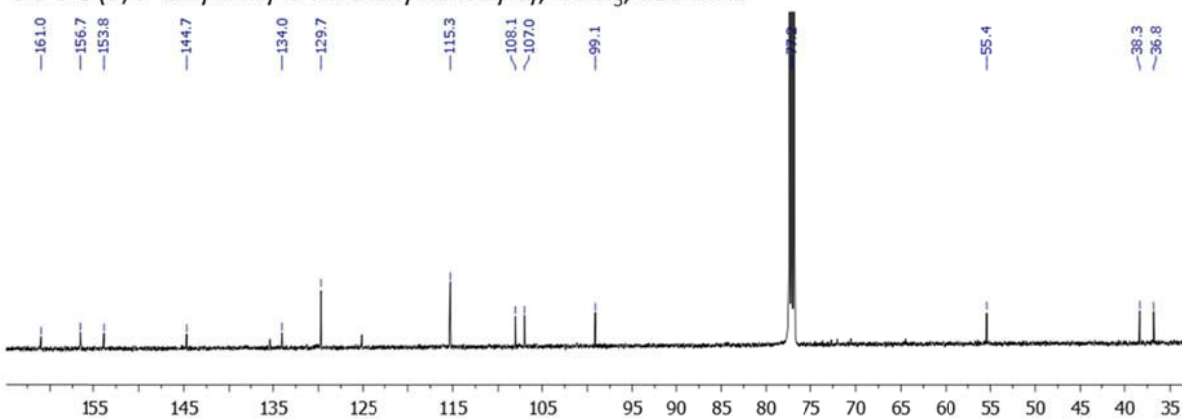
RMN ¹H

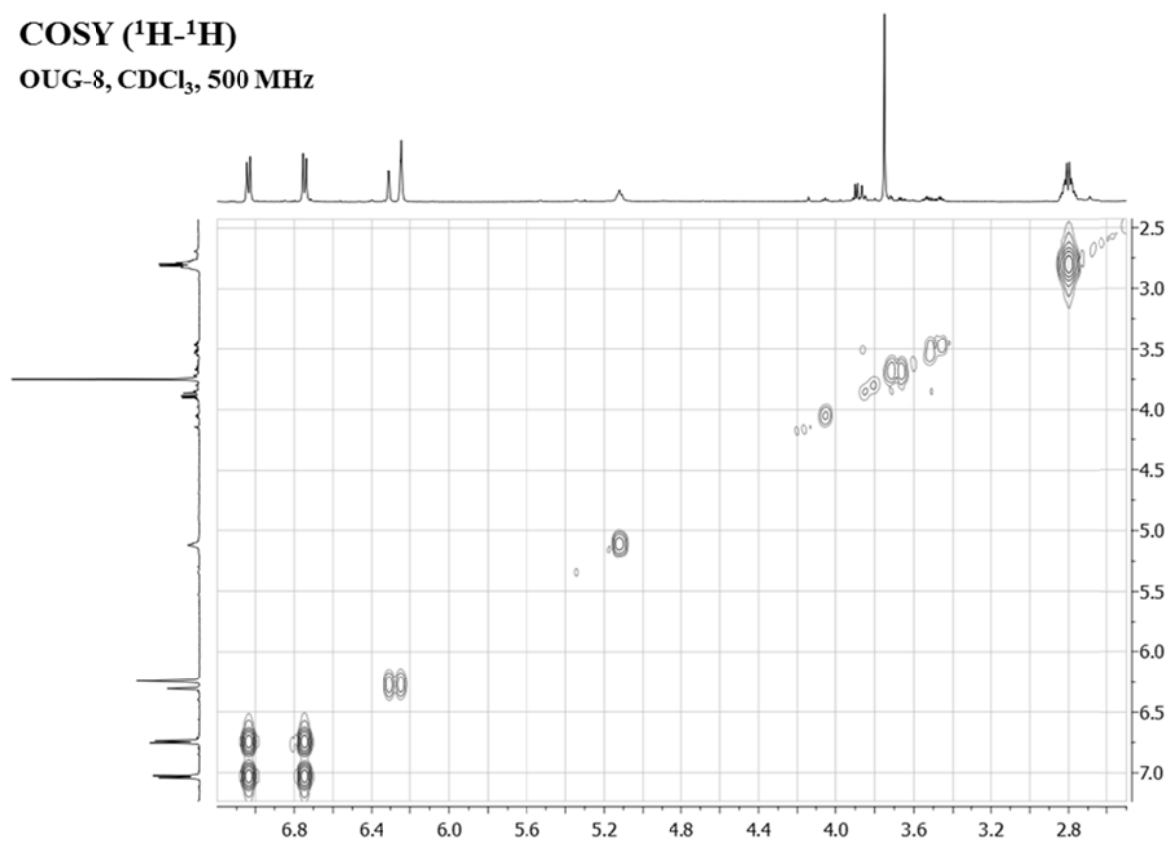
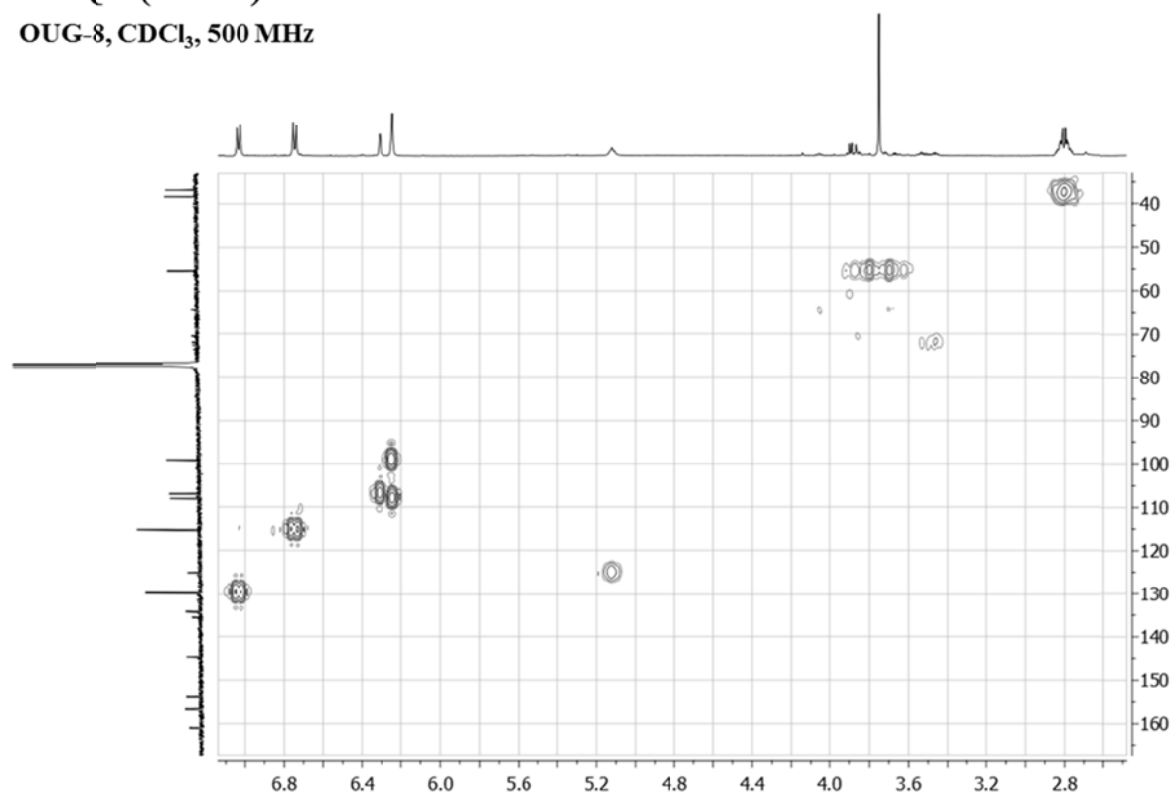
OUG-8 (3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle), CDCl₃, 500 MHz

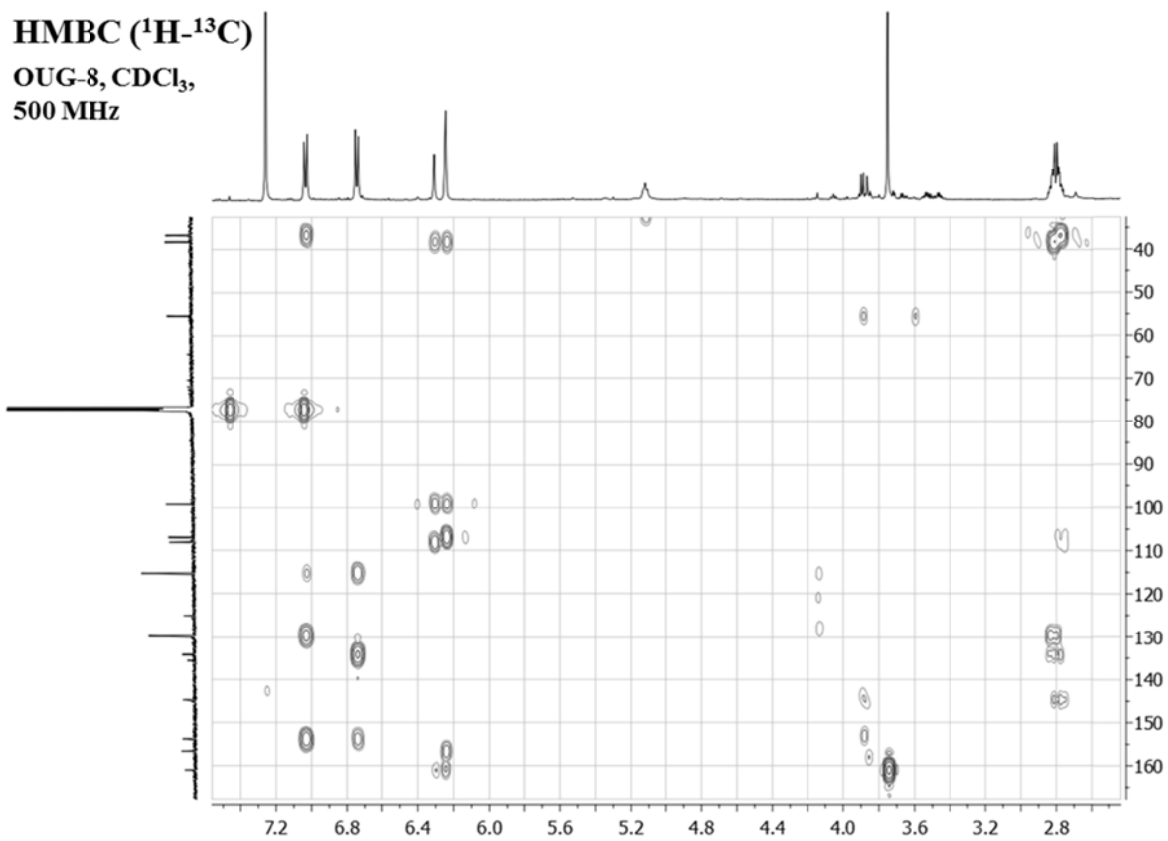


RMN ¹³C

OUG-8 (3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle), CDCl₃, 125 MHz



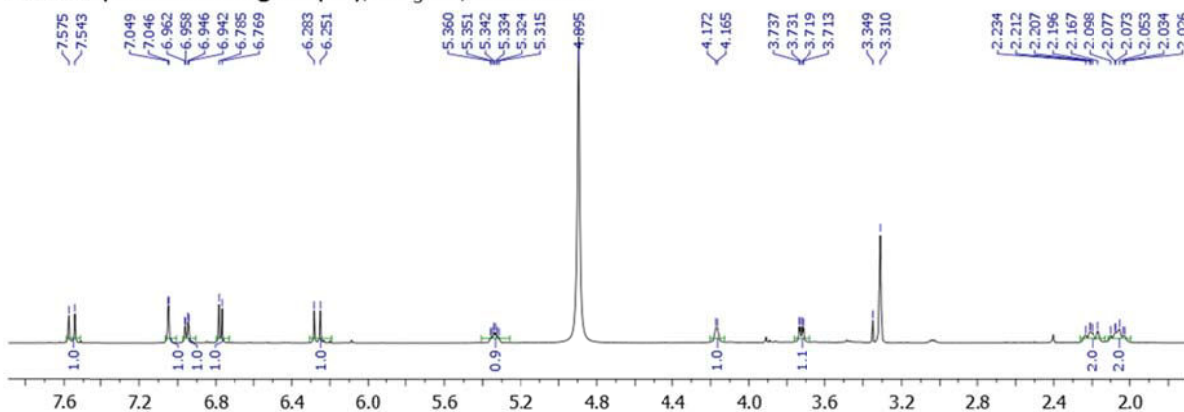
COSY (^1H - ^1H)OUG-8, CDCl_3 , 500 MHzHMQC (^1H - ^{13}C)OUG-8, CDCl_3 , 500 MHz



ANNEXE 13 : Spectres RMN de l'acide chlorogénique (OUG-9)

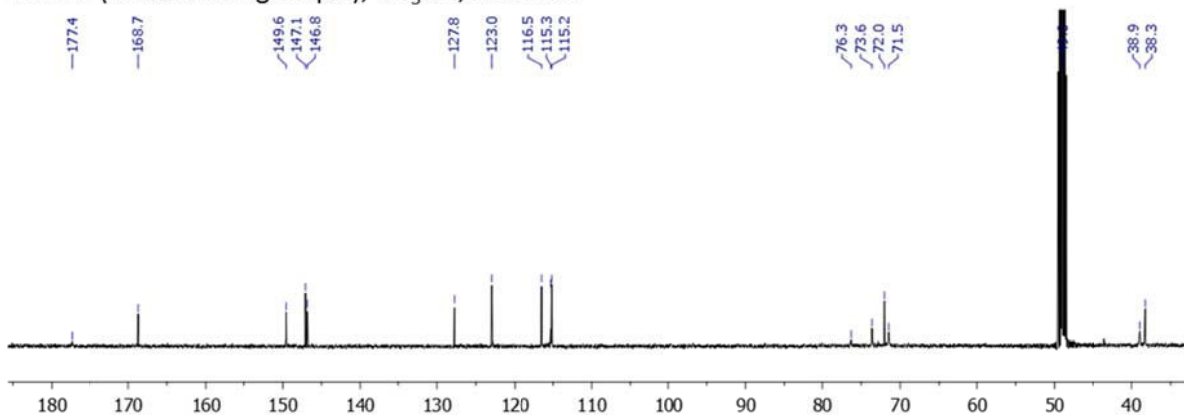
RMN ¹H

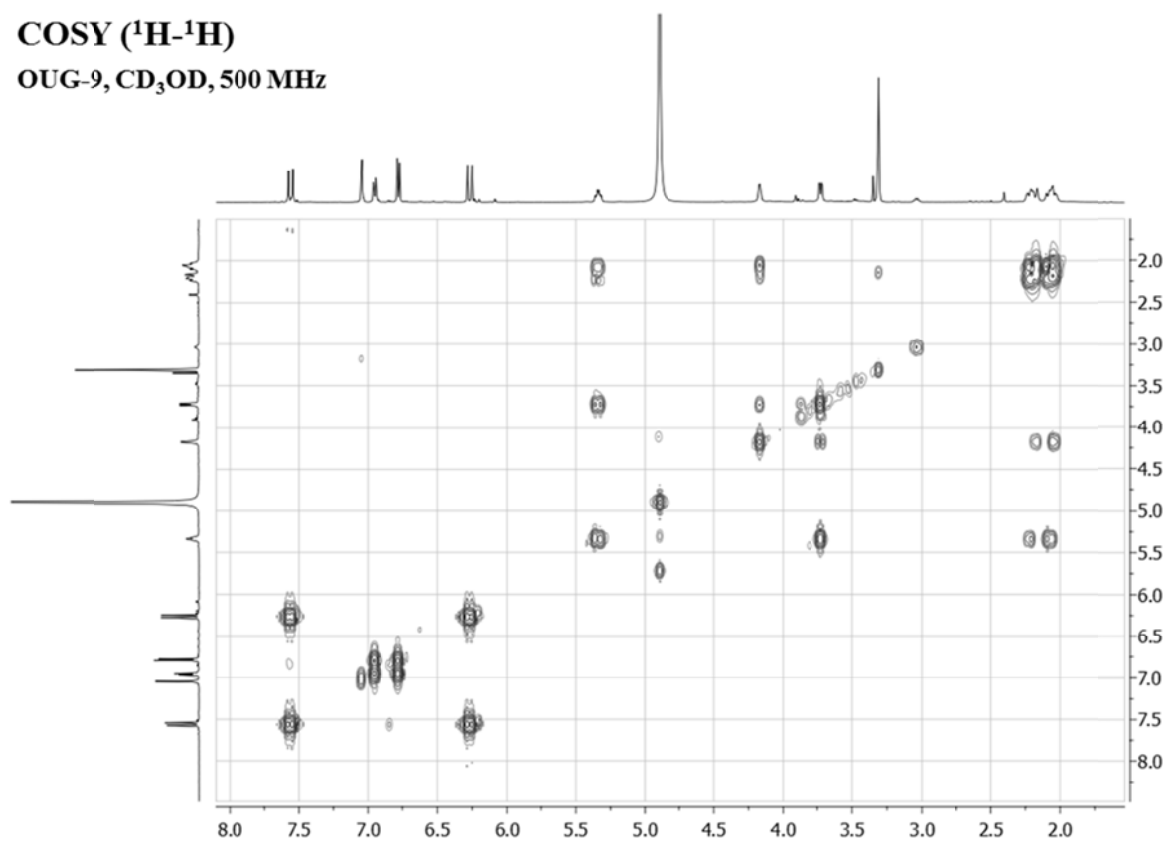
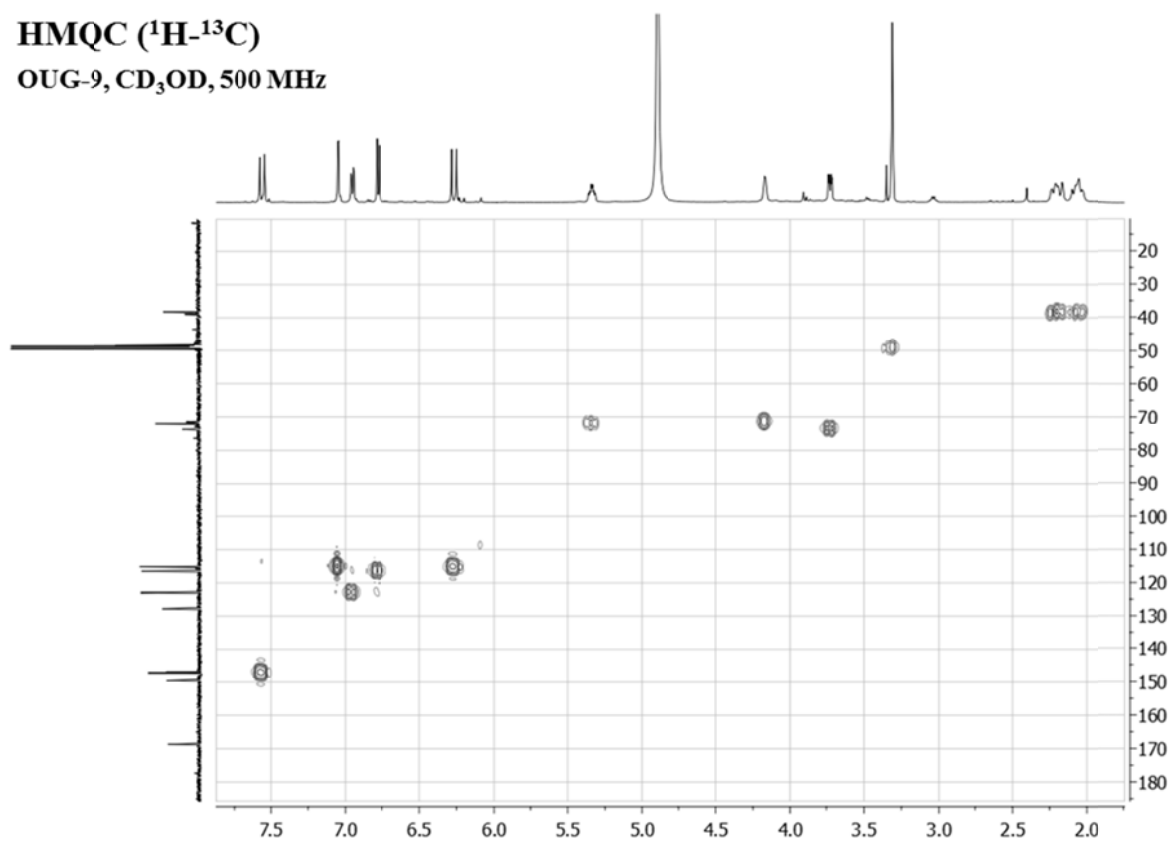
OUG-9 (acide chlorogénique), CD₃OD, 500 MHz

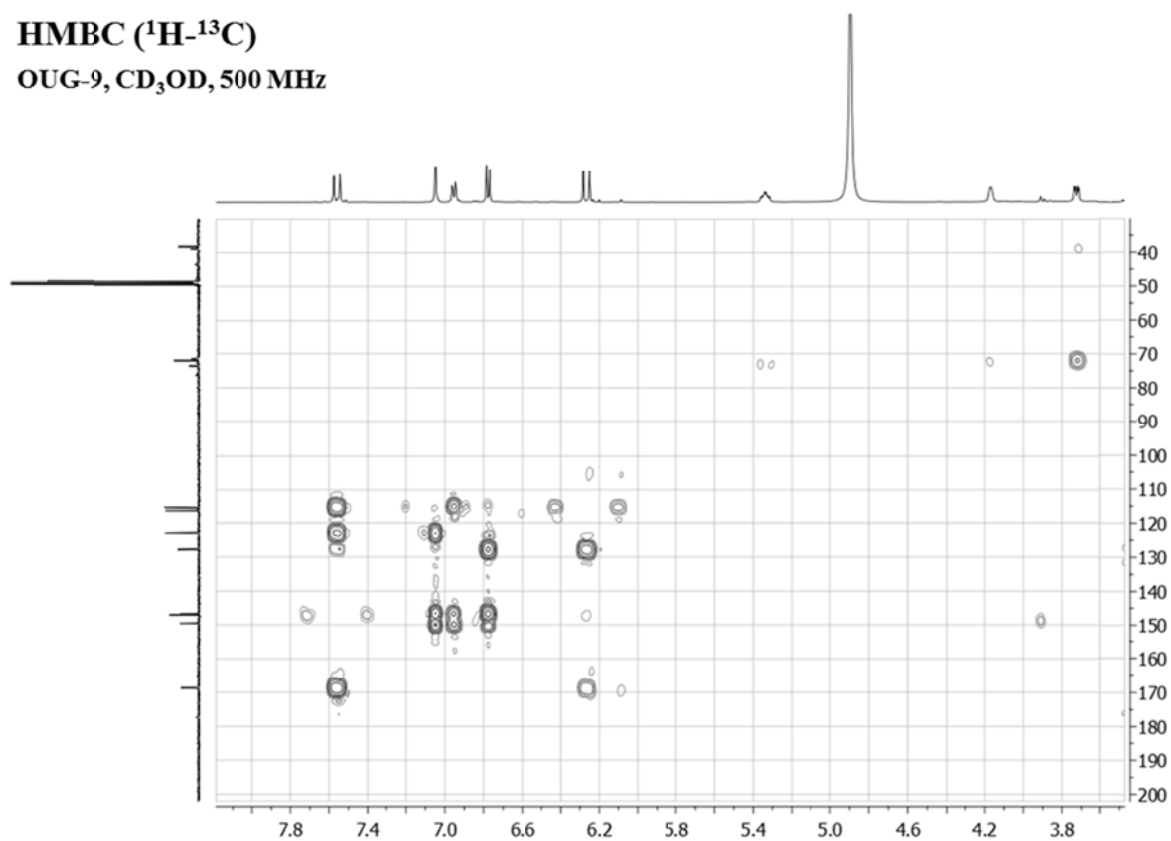
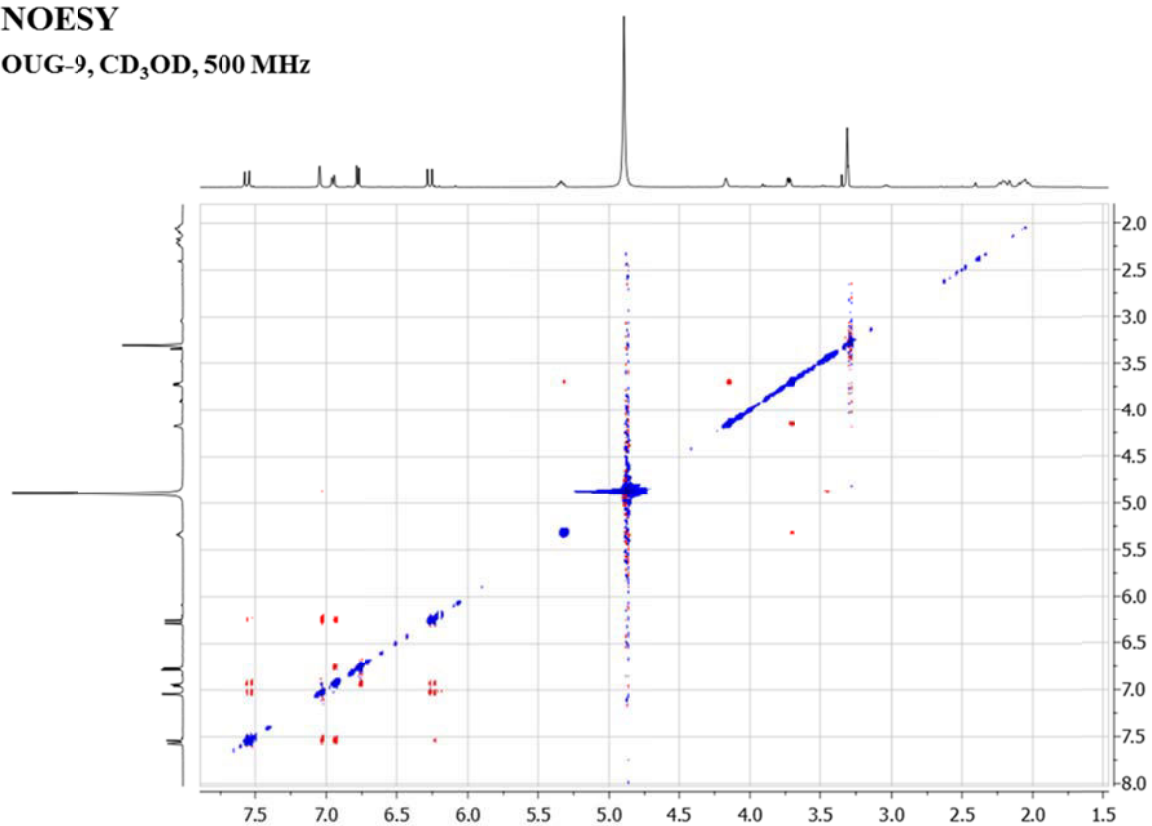


RMN ¹³C

OUG-9 (acide chlorogénique), CD₃OD, 125 MHz



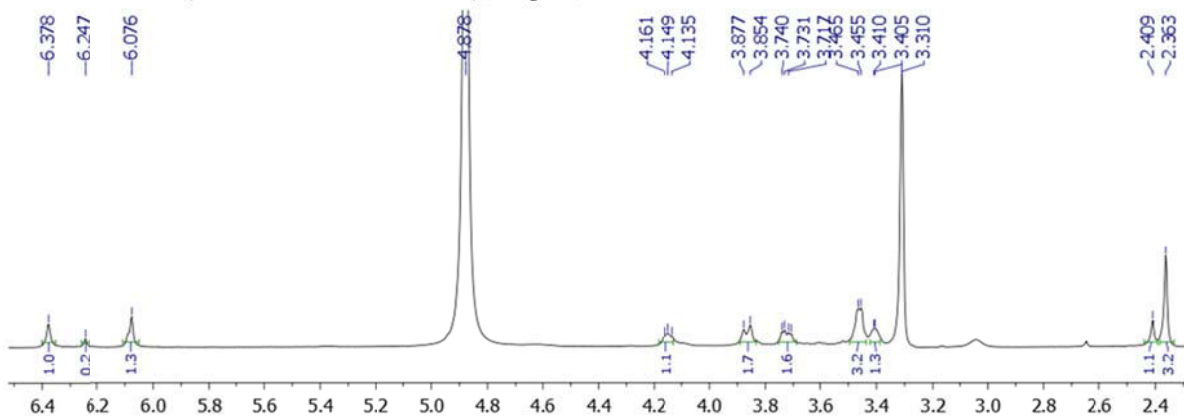
COSY (^1H - ^1H)OUG-9, CD_3OD , 500 MHz**HMQC (^1H - ^{13}C)**OUG-9, CD_3OD , 500 MHz

HMBC (^1H - ^{13}C)OUG-9, CD_3OD , 500 MHz**NOESY**OUG-9, CD_3OD , 500 MHz

ANNEXE 14 : Spectres RMN des biflorine et isobiflorine (OUG-10 et 11)

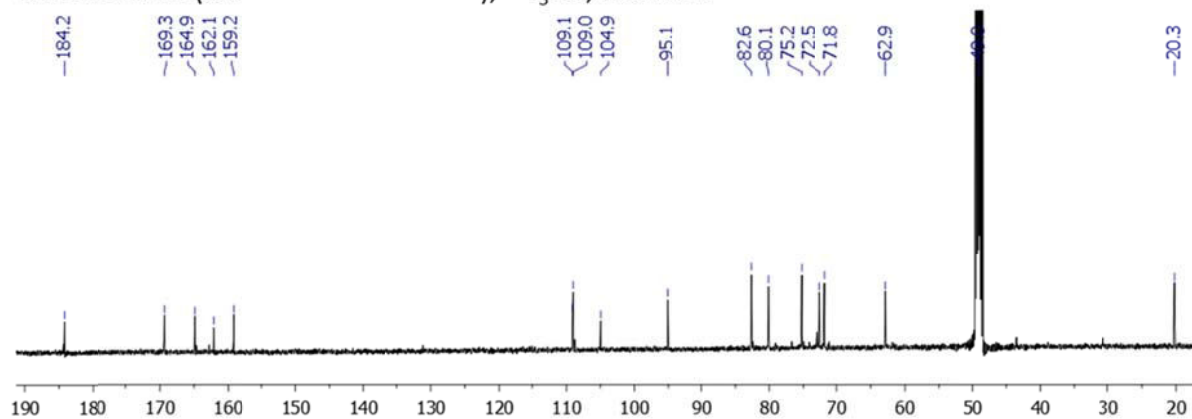
RMN ¹H

OUG-10 et 11 (biflorine et isobiflorine), CD₃OD, 500 MHz



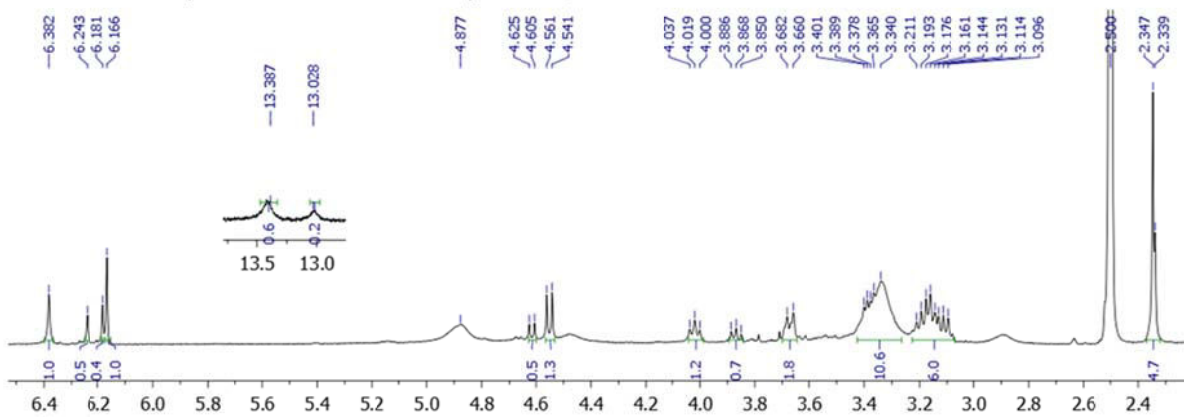
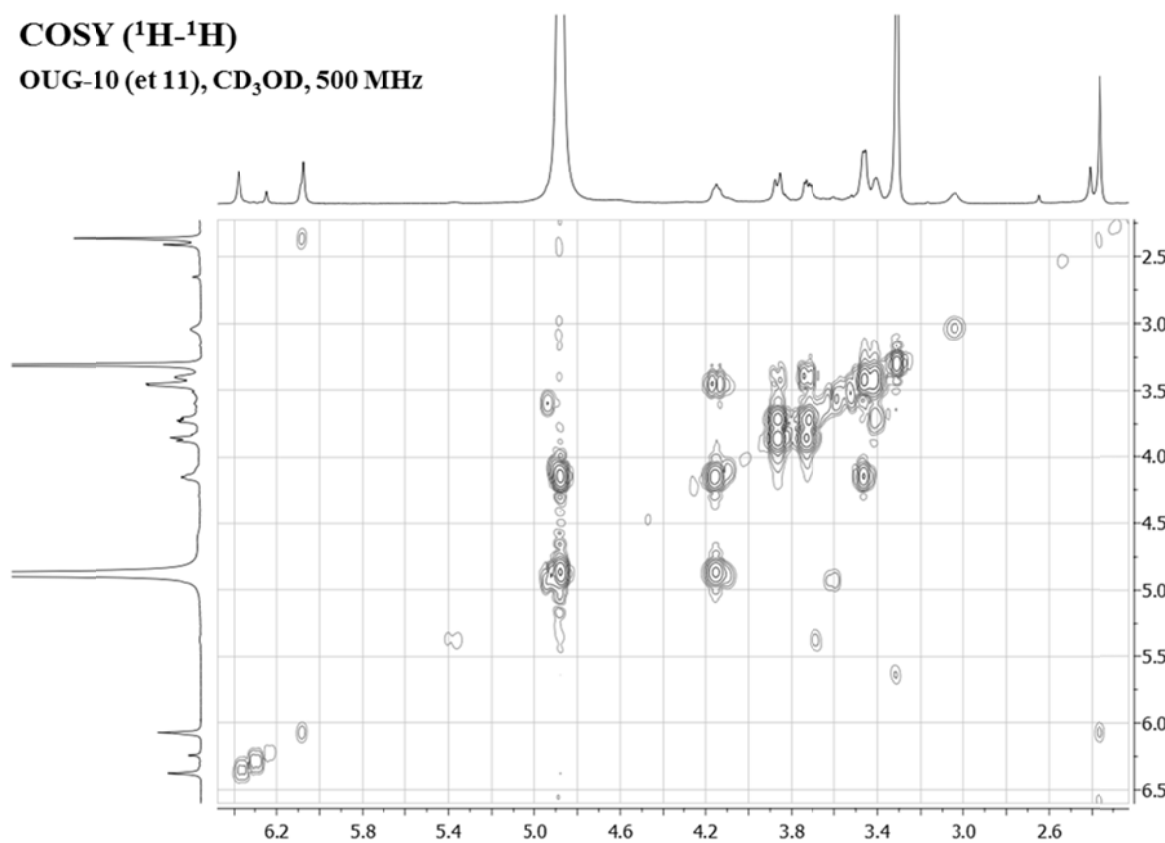
RMN ¹³C

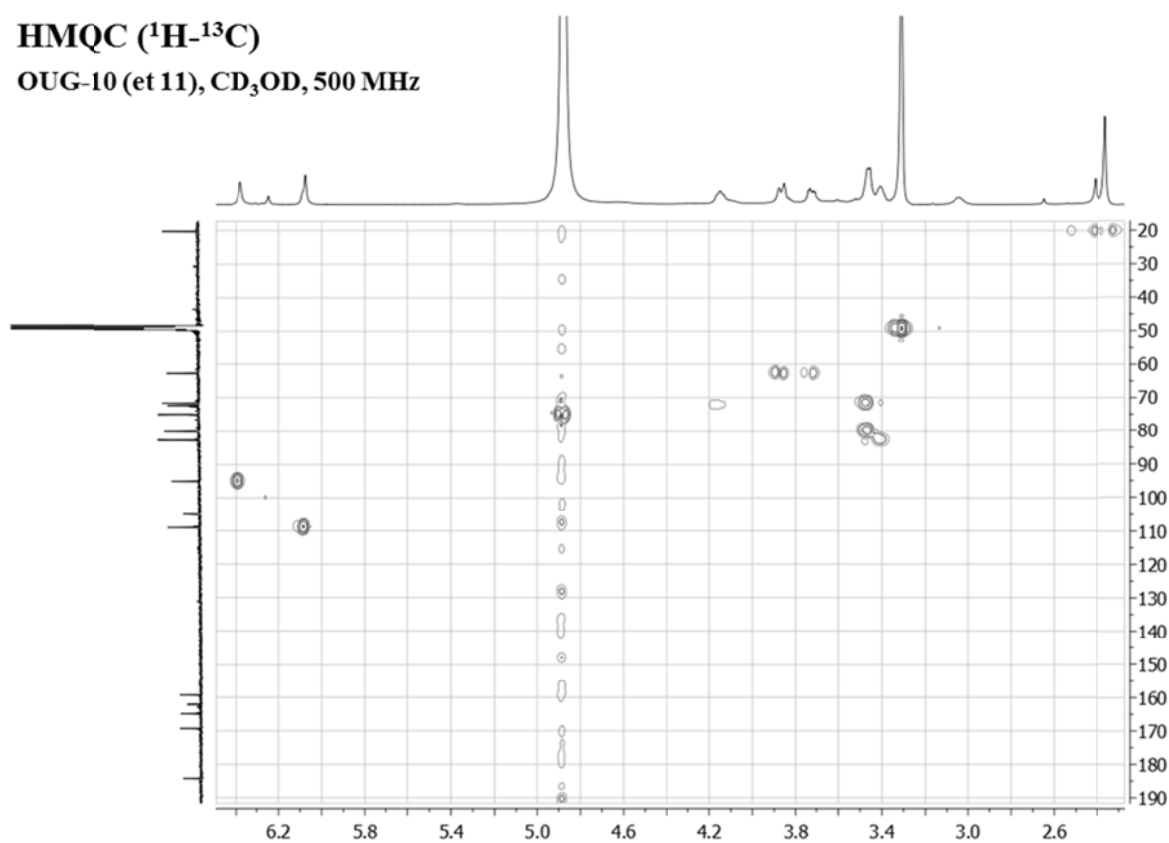
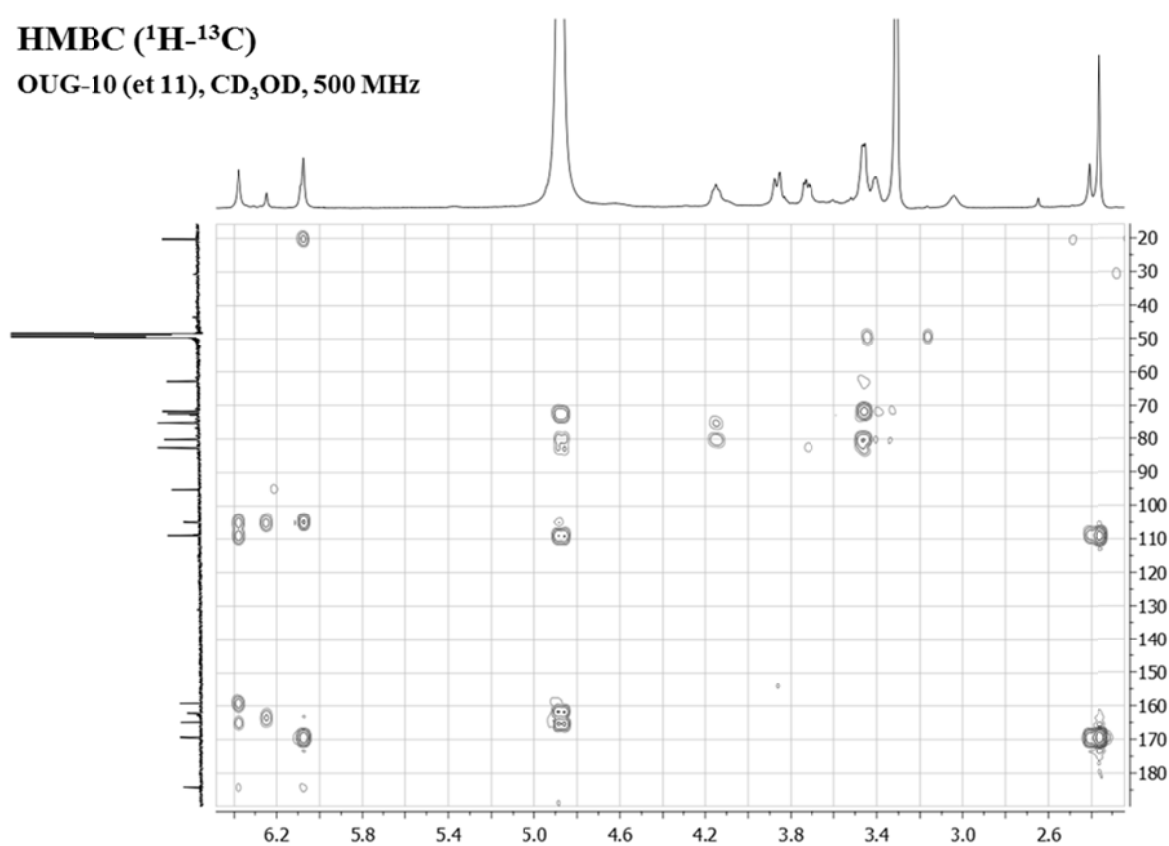
OUG-10 et 11 (biflorine et isobiflorine), CD₃OD, 125 MHz



RMN ^1H (DMSO)

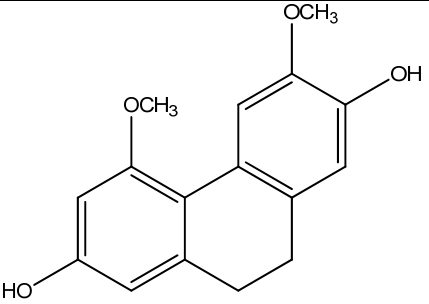
OUG-10 et 11 (biflorine et isobiflorine), DMSO, 500 MHz

COSY (^1H - ^1H)OUG-10 (et 11), CD_3OD , 500 MHz

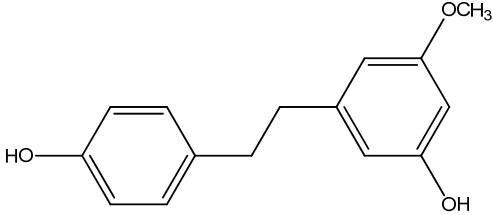
HMQC (^1H - ^{13}C)OUG-10 (et 11), CD_3OD , 500 MHz**HMBC (^1H - ^{13}C)**OUG-10 (et 11), CD_3OD , 500 MHz

ANNEXE 15 : Récapitulatif des composés identifiés dans la propolis ougandaise OUG-7 à 11

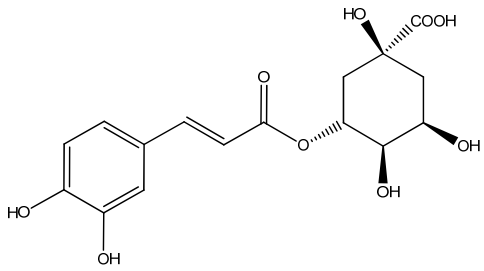
Composé OUG-7

Nom	6-méthoxycoelonine	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	
Masse molaire	272 g/mol	
Temps de rétention	10.6 min (méthode 3)	
Profil UV (λ_{\max})	276, 302 nm	
Données MS (m/z)	[M-H] ⁻ : 271	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) : 2.67 (m, 2H), 2.68 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.35 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.42 (d, J=2.2, 1H), 6.78 (s, 1H), 7.86 (s, 1H) ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) : 29.1, 30.9, 55.8, 56.3, 98.3, 107.6, 111.4, 113.6, 116.8, 124.8, 131.5, 141.4, 143.7, 144.5, 154.7, 157.7	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C (1D et 2D), références ^{298,299} OUG-DCM CF14-F	

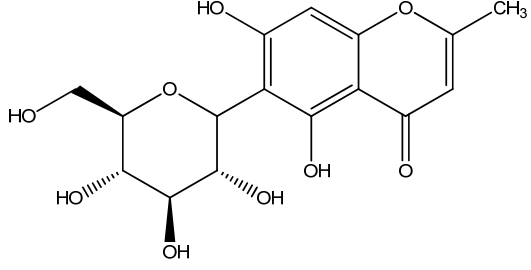
Composé OUG-8

Nom	3,4'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	
Masse molaire	244 g/mol	
Temps de rétention	14.1 min (méthode 3)	
Profil UV (λ_{\max})	277 nm	
Données MS (m/z)		[M+H] ⁺ : 245
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) : 2.80 (m, 2H), 2.81 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 6.25 (m, 2H), 6.31 (m, 1H), 6.75 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.03 (d, J=8.4Hz, 2H) ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) : 36.8, 38.3, 55.4, 99.1, 107.0, 108.1, 115.3(x2), 129.7(x2), 134.0, 144.7, 153.8, 156.7, 161.0	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, MS (CI), RMN ¹ H et ¹³ C (1D et 2D), références ³⁰⁰ OUG-DCM CF14-G	

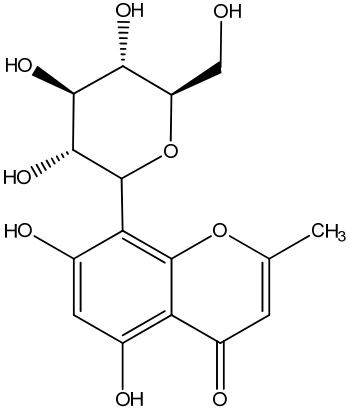
Composé OUG-9

Nom	Acide chlorogénique (acide 3-caféoylquinique)	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	
Masse molaire	354 g/mol	
Temps de rétention	12.0 min (méthode 4)	
Profil UV (λ_{\max})	295, 326 nm	
Données MS (m/z)		[M+H] ⁺ 355, [M+Na] ⁺ 377, [2M+Na] ⁺ 731
Données RMN (δ en ppm)		¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) : 2.07 (m, 2H), 2.20 (m, 2H), 3.73 (dd, J=9.0, 3.0Hz, 1H), 4.17 (d, J=3.0Hz, 1H), 5.34 (td, J=9.0, 4.5Hz, 1H), 6.27 (d, J=16.0Hz, 1H), 6.78 (d, J=8.0Hz, 1H), 6.95 (dd, J=8.0, 2.0Hz, 1H), 7.05 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.56 (d, J=16.0Hz, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) : 38.3, 38.9, 71.5, 72.0, 73.6, 76.3, 115.2, 115.3, 116.5, 123.0, 127.8, 146.8, 147.1, 149.6, 168.7, 177.4
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C (1D et 2D), références ^{301,302} OUG-MeOH CF15-A	

Composé OUG-10

Nom	Biflorine	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	
Masse molaire	354 g/mol	
Temps de rétention	12.6 min (méthode 4)	
Profil UV (λ_{\max})	298, 325sh nm	
Données MS (m/z)		[M+H] ⁺ 355, [M+Na] ⁺ 377, [2M+Na] ⁺ 731
Données RMN (δ en ppm)		¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) : 2.36 (s, 3H), 3.41 (m, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.72 (dd, J=11.5, 4.5Hz, 1H), 3.87 (d, J=11.5Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.88 (d, J=6.0, 1H), 6.08 (s, 1H), 6.38 (s, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) : 20.3, 62.9, 71.8, 72.5, 75.2, 80.1, 82.6, 95.1, 104.9, 109.0, 109.1, 159.2, 162.1, 164.9, 169.3, 184.2
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C (1D et 2D), références ³⁰⁶⁻³⁰⁹ OUG-MeOH CF15-C	

Composé OUG-11

Nom	Isobiflorine	
Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	
Masse molaire	354 g/mol	
Temps de rétention	10.0 min (méthode 4)	
Profil UV (λ_{\max})	298, 325sh nm	
Données MS (<i>m/z</i>)	[M-H] ⁻ : 353	
Données RMN (δ en ppm)	¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) : 2.41 (s, 3H), 3.41 (m, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.72 (dd, J=11.5, 4.5Hz, 1H), 3.87 (d, J=11.5Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.88 (d, J=6.0, 1H), 6.08 (s, 1H), 6.25 (s, 1H) ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) : 20.3, 62.9, 71.8, 72.5, 75.2, 80.1, 82.6, 95.1, 104.9, 109.0, 109.1, 159.2, 162.1, 164.9, 169.3, 184.2	
Identification par Fraction source	HPLC/UV, HPLC/MS, RMN ¹ H et ¹³ C, références ³⁰⁹ OUG-MeOH CF15-C	

Publications

Chemical Composition, Antioxidant and Anti-AGEs Activities of a French Poplar Type Propolis

Séverine Boisard,[†] Anne-Marie Le Ray,[†] Julia Gatto,[†] Marie-Christine Aumond,[†] Patricia Blanchard,[†] Séverine Derbré,[†] Catherine Flurin,[‡] and Pascal Richomme^{*†}

[†]EA 921 SONAS/SFR 4207 QUASAV, Université d'Angers, 16 Boulevard Daviers, 49045 Angers cedex 01, France

[‡]Ballot-Flurin Apiculteurs, La Miellerie, Chemin de Balas, 65700 Lahitte-Toupi  re, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Accumulation in tissues and serum of advanced glycation end-products (AGEs) plays an important role in pathologies such as Alzheimer's disease or, in the event of complications of diabetes, atherosclerosis or renal failure. Therefore, there is a potential therapeutic interest in compounds able to lower intra and extracellular levels of AGEs. Among them, natural antioxidants (AO) with true anti-AGEs capabilities would represent good candidates for development. The purpose of this study was to evaluate the AO and anti-AGEs potential of a propolis batch and then to identify the main compounds responsible for these effects. In vivo, protein glycation and oxidative stress are closely related. Thus, AO and antiglycation activities were evaluated using both DPPH and ORAC assays, respectively, as well as a newly developed automated anti-AGEs test. Several propolis extracts exhibited very good AO and anti-AGEs activities, and a bioguided fractionation allowed us to identify pinobanksin-3-acetate as the most active component.

KEYWORDS: *poplar type propolis, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant, anti-AGEs*

■ INTRODUCTION

Propolis is a resinous material, most commonly collected by honeybees from buds and exudates of various trees and plants. Propolis has been largely used in folk medicine since ancient times due to its pharmacological potential associated with antioxidant,^{1,2} anti-inflammatory³ as well as antimicrobial^{4,5} properties.

Propolis is generally composed of 50% of resin and balm (including polyphenolic compounds), 30% of wax and fatty acids, 10% of essential oils, 5% of pollen, and 5% of various organic and inorganic compounds. The composition of propolis can be specified as it depends on the vegetation at the site of collection. Indeed, propolis from temperate climatic zones, like Europe, North America, and nontropical regions of Asia, originate mainly from the bud exudates of *Populus* species and are rich in flavonoids, phenolic acids, and their esters,⁶ whereas tropical propolis are rich in prenylated derivatives of *p*-coumaric acids, benzophenones, and terpenoids,^{1,7} as no poplars or birches grow in this region.

During Maillard's reaction, a nucleophilic addition between a free amino group and a carbonyl group of a reducing sugar leads to the glycation of proteins. The resulting Schiff base rearranges to a more stable ketoamine, the so-called Amadori product, which can undergo further reactions, involving dicarbonyl intermediates, giving advanced glycation end-products (AGEs) (Figure 1).⁸ Extra and intracellular accumulation of AGEs with time play an important role in the development of organ damage in such a way that AGEs are involved in many important pathologies, including Alzheimer's disease⁹ and complications of diabetes⁸ such as atherosclerosis¹⁰ or renal failure.¹¹ Therefore, numerous compounds have been investigated for their anti-AGEs activity, and the synthetic

hydrazine aminoguanidine has received the most efforts to be developed as a drug.⁸ Protein glycation is a self-generated process. Thus, any potential inhibitor of AGEs formation should exhibit a long half-life while being virtually atoxic. Because reactive oxygen species (ROS) are involved in AGEs formation, a food diet rich in antioxidants may protect the organism against AGEs accumulation as well as free radicals derived via glycation (Figure 1). There has also been a growing interest in natural products exhibiting both anti-AGEs and antioxidant properties. In that way, plant polyphenols such as quercetin have already been reported to significantly inhibit glycation in vitro and in vivo.¹² On the one hand, poplar type (such as European type) propolis generally exhibits high total polyphenol contents (≈ 200 – 300 mg of gallic acid equivalent/gram of extract), whereas, on the other hand, very few chemical studies on French-originated propolis were available in the literature.¹³ Thus, the purpose of this paper was to identify the polyphenol constituents of a French-originated propolis mixture and to evaluate both their antioxidant and anti-AGEs potential. Even collected in the same geographical region, propolis may differ qualitatively and quantitatively between apiaries and even inside the same apiary from one hive to another one.¹⁴ Keeping in mind any potential economic development, it then appeared more appropriate to study a mixture (i.e., some material exhibiting an average chemical composition) rather than a specific sample. Therefore, 24 batches of propolis collected over two years (2010 and 2011)

Received: November 27, 2013

Revised: January 9, 2014

Accepted: January 20, 2014

Published: January 20, 2014

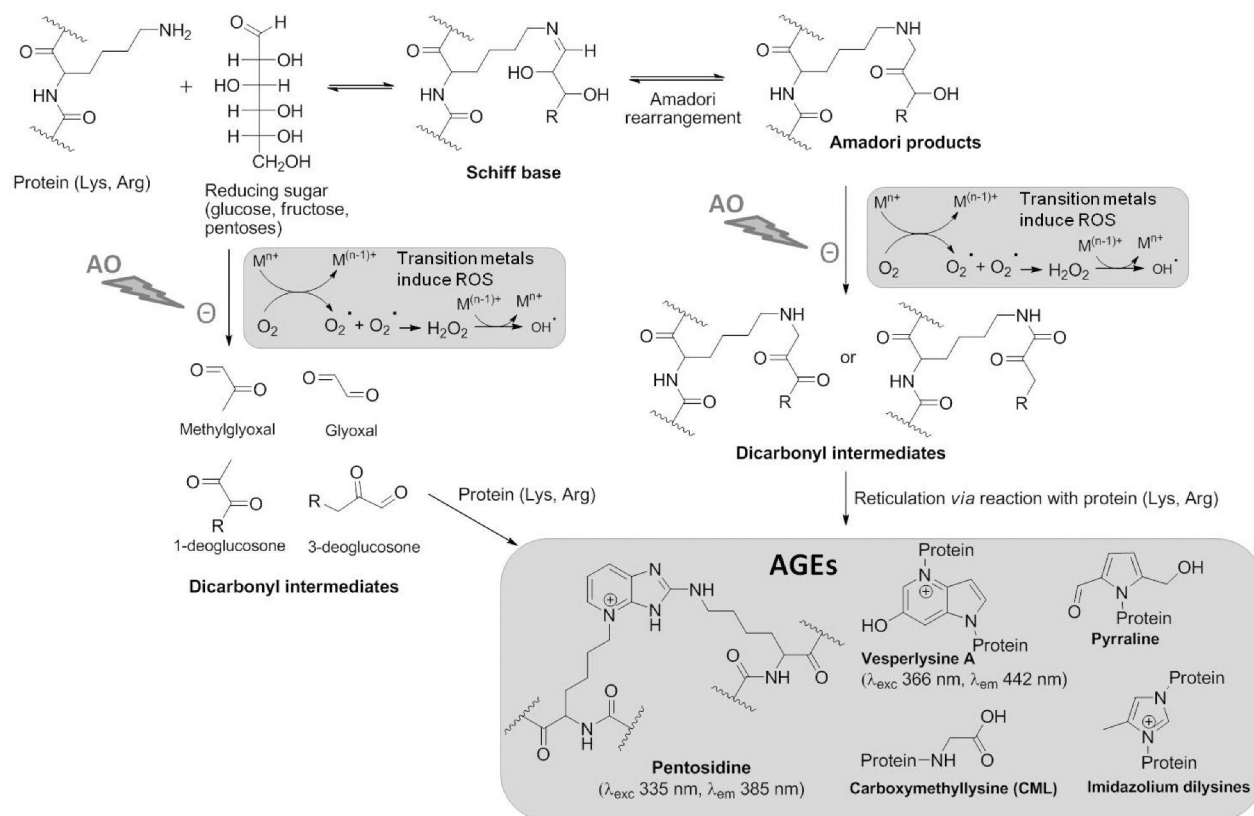


Figure 1. Schematic formation of AGEs. AGEs inhibitors may follow different inhibition pathways in order to prevent AGEs formation. For example, they can prevent glycation via reaction with free amino groups in proteins or carbonyl groups on reducing sugars. In addition, compounds with antioxidant (AO) properties (free radical scavengers or transition metal chelators) may reduce reactive oxygen species (ROS). Finally, they can also scavenge α,β -dicarbonyl intermediates or break them (AGEs breakers) [adapted from Ahmed, 2005⁸].

from different places in France (Figure 2) were homogeneously mixed to undergo this study. For the same reason, various

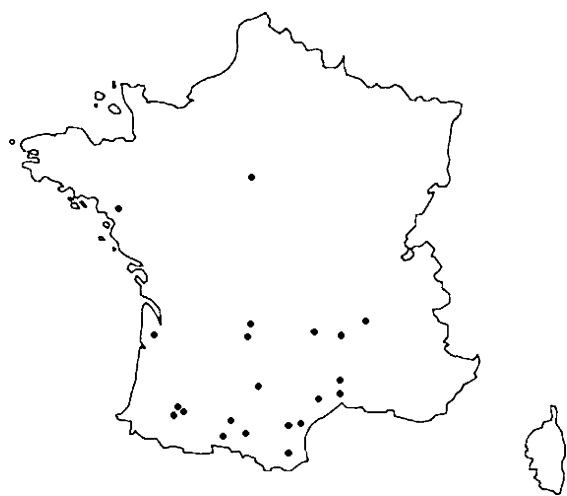


Figure 2. Collection sites of French propolis samples.

extracts using different solvents or mixtures of solvents were prepared in order to find the more appropriate extraction conditions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), aluminum chloride hexahydrate, Folin–Ciocalteu reagent, potassium

acetate, 2,4-dinitrophenylhydrazine, formic acid, gallic acid, quercetin, naringenin, *p*-coumaric acid, ferulic acid, isoferulic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, prenyl caffeate, bovine serum albumin (BSA, fraction V), potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic trihydrate, sodium azide, aminoguanidine hydrochloride, all of analytical grade, were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), fluorescein (FL), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 5'-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), caffeic acid, and chrysin were obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). Ribose was from Alfa Aesar (Schiltigheim, France). Galangin was purchased from Extrasynthese (Genay, France), and caffeic acid phenylethyl ester was purchased from Tocris biosciences (Bristol, United Kingdom). Pinocembrin, pinobanksin-3-acetate, and pinostrobin were isolated from the DCM extract of propolis.

Propolis Batch. A batch (240 g) corresponding to 24 propolis samples (10 g of each), collected in 2010 and 2011 in apiaries originating from different regions of France was used for this study. This batch was provided by the “Ballot-Flurin Apiculteurs” company, specialized in organic beekeeping. The different collection sites of propolis samples are given in Figure 2.

Instrumentation. NMR spectra (1D and 2D) were recorded on a Bruker (Wissembourg France) Avance spectrometer at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. Absorbances were obtained from a Tecan (Lyon, France) Infinite M200 microplate spectrophotometer.

Extractions. The propolis batch was homogeneously pulverized in the presence of liquid nitrogen and divided into 1 g samples. Four different extractions were then carried out on 1 g samples with water (E1), 95% EtOH (E2), 70% EtOH (E3), and MeOH (E4). Then, two extractions, preceded by a cyclohexane wax elimination, were independently performed on 1 g samples with DCM (E5) and a mixture of DCM, MeOH, and H₂O (31/19/4) (E6). For E1, a decoction of 1 g of propolis powder was boiled in 20 mL H₂O at 100 °C for 15 min. After the samples were cooled, the solidified wax and the residue were removed by filtration, and the filtrate was concentrated. For other solvents, 1 g of propolis powder (or of residue issued from a previous extraction) was macerated in 3 × 20 mL of solvent. After stirring for 3 × 2 h at room temperature, the mixture was filtered. The filtrates were gathered and evaporated under vacuum.

Total Polyphenol Content. Total polyphenol content was determined according to the Folin–Ciocalteu colorimetric method.¹⁵ Briefly, 20 μL of extract solution (2.5 mg/mL in MeOH) were mixed with 280 μL of distilled water and 100 μL of Folin–Ciocalteu's phenol reagent. After 3 min, 1200 μL of distilled water and 400 μL of 20% aqueous sodium carbonate solution were added. Aliquots (200 μL) of each solution were distributed in a 96-well microtiter plate. The absorbance was measured at 760 nm after 30 min in the dark at room temperature. A blank was prepared in the same way by using MeOH instead of the extract solution. Gallic acid was used to calculate the calibration curve (0.4–1.2 mg/mL; $y = 0.5800x$; $r^2 = 0.9941$), and total polyphenol contents were expressed in terms of gallic acid equivalent (mg) per gram of extract (mg GAE/g). All measurements were performed in triplicate.

Flavone and Flavonol Content. Flavone and flavonol content was determined according to the aluminum chloride colorimetric method described by Woisky and Salantino.¹⁶ Three hundred microliters of 95% EtOH was mixed with 100 μL of extract solution (1.5 mg/mL in EtOH 80%), 20 μL of 10% aqueous aluminum chloride solution, 20 μL of 1 M potassium acetate aqueous solution, and 560 μL of distilled water. Two hundred microliters of each solution was put into the 96-well microtiter plate. After the samples were incubated at room temperature for 30 min, the absorbance was measured at 415 nm. The amount of 10% aqueous aluminum chloride solution was replaced by the same amount of distilled water in blank for each extract solution. Quercetin, used as standard, was prepared at concentrations of 25–200 μg/mL to build the calibration curve ($y = 2.7677x$; $r^2 = 0.9988$). Flavone and flavonol content were expressed as mg QE/g (quercetin equivalent per gram of extract). All assays were performed in triplicate.

Flavanone and Dihydroflavonol Content. The modified method described by Nagy and Grancai¹⁷ was used to determine flavanone and dihydroflavonol content. Briefly, 500 μL of extract solution (2.5 mg/mL in MeOH) was reacted with 250 μL of MeOH and 500 μL of 1% 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) solution (500 mg of DNP mixed with 1 mL of 96% sulfuric acid and diluted to 50 mL with MeOH) at 50 °C for 50 min. After the solution was cooled, 500 μL of the solution were mixed with 500 μL of 20% potassium hydroxide in 70% EtOH and then centrifuged at 4000 rpm for 10 min to remove the precipitate. Twenty microliters of the supernatant was collected, put into the 96-well microtiter plate, and mixed with 180 μL of 1% potassium hydroxide methanolic solution. Absorbance was measured at 495 nm. A blank was prepared

using the same amount of MeOH instead of the extract solution. Standard solutions of (+)-naringenin (0.25–2.00 mg/mL in MeOH) were used to build the calibration curve ($y = 0.2053x$; $r^2 = 0.9945$). Flavanone and dihydroflavonol content was calculated as mg NE/g (naringenin equivalent per gram of extract). All measurements were performed in triplicate.

HPLC-DAD and HPLC-MS Procedures. Five milligrams of propolis extracts dissolved in 1 mL of MeOH were centrifuged at 13000 rpm for 10 min and filtered through a 0.2 μm nylon-membrane syringe filter prior to injection (10 μL). Analytical HPLC was run on a 2695 Waters (Guyancourt, France) separation module equipped with a diode array detector 2996 Waters. Separation was achieved on a Phenomenex (Le Pecq, France) Luna column 3 μm C18 100A (150 × 4.6 mm i.d., 3 μm) protected with a Phenomenex SecurityGuard cartridge C18 (4 × 3 mm i.d.) at a flow rate of 0.4 mL/min. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in MeOH (solvent B). The separation was performed using the following gradient: 40% B (0–10 min), 40–50% B (10–25 min), 50–60% B (25–55 min), 60–90% B (55–70 min), 90% B (70–80 min). UV detection and quantification were achieved at two wavelengths: 254 and 280 nm. The mass analyses were performed on a Bruker (Bremen, Germany) ESI/APCI Ion Trap Esquire 3000+ in both, positive and negative modes, with the conditions as follows: collision gas, He; collision energy amplitude, 1.3 V; nebulizer and drying gas, N₂, 7 L/min; pressure of nebulizer gas, 30 psi; dry temperature, 340 °C; flow rate, 1.0 mL/min; solvent split ratio 1:9; scan range, m/z 100–1000.

Quantification of 12 Compounds by HPLC/DAD. MeOH stock solutions of 12 major compounds chosen as markers for this quantification analysis were prepared as follows: caffeic acid (0.5 mg/mL), *p*-coumaric acid (0.5 mg/mL), ferulic acid (0.3 mg/mL), isoferulic acid (0.3 mg/mL), 3,4-dimethoxycinnamic acid (0.3 mg/mL), pinocembrin (0.8 mg/mL), pinobanksin-3-acetate (1.0 mg/mL), prenyl caffeate (0.4 mg/mL), chrysin (0.8 mg/mL), caffeic acid phenylethyl ester (CAPE) (0.3 mg/mL), galangin (0.6 mg/mL) and pinostrobin (0.2 mg/mL). Stock solutions were diluted (3/4, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) and used to determine the calibration curves of the 12 markers ($n = 2$): caffeic acid ($y = 78,027x$; $r^2 = 0.9999$), *p*-coumaric acid ($y = 113,20x$; $r^2 = 0.9999$), ferulic acid ($y = 78,364x$; $r^2 = 0.9999$), isoferulic acid ($y = 103,68x$; $r^2 = 0.9998$), 3,4-dimethoxycinnamic acid ($y = 77,748x$; $r^2 = 0.9998$), pinocembrin ($y = 54,982x$; $r^2 = 0.9998$), pinobanksin-3-acetate ($y = 49,022x$; $r^2 = 0.9994$), prenyl caffeate ($y = 60,462x$; $r^2 = 0.9987$), chrysin ($y = 100,4x$; $r^2 = 0.9998$), CAPE ($y = 43,434x$; $r^2 = 0.9996$), galangin ($y = 48,653x$; $r^2 = 0.9984$) and pinostrobin ($y = 93,633x$; $r^2 = 0.9995$). All propolis extracts (E1 to E6) were analyzed in triplicate.

Fractionation by Flash Chromatography. Fifty grams of the propolis mixture was extracted with cyclohexane (3 × 200 mL, 2 h, room temperature) to remove beeswax. Then, the residue was extracted with DCM (5 × 200 mL, 2 h, room temperature), filtered, and concentrated to give 25.0 g of DCM extract (50% yield). Twenty-one grams of DCM extract was dissolved in 200 mL of DCM, mixed with 42 g of silica gel (extract/silica gel: 1/2), and concentrated to obtain a dry thin powder. Fractionation was performed using a CombiFlash Teledyne ISCO (Lincoln, NE, U.S.A.) apparatus, on a prepacked silica gel column (Interchim PF-50SI HC/300g, 50 μm, 20 bar) at a flow rate of 100 mL/min with the following gradient: 100% C₆H₁₂ (2.0 L), C₆H₁₂:EtOAc 90:10 (1.7 L),

Table 1. Extraction Yield, Total Polyphenol (TP), Flavone/Flavonol (FF), and Flavanone/Dihydroflavonol (FD) Contents of French Propolis Extracts (E1–E6)

extract	solvent	extraction yield (%)	TP ^a (mg GAE/g)	FF ^b (mg QE/g)	FD ^c (mg NE/g)
E1	H ₂ O	6.9 ± 0.4	292.1 ± 13.1	20.5 ± 1.2	76.6 ± 7.7
E2	EtOH	68.4 ± 0.8	253.6 ± 5.1	67.0 ± 2.6	153.1 ± 2.5
E3	70% EtOH	65.3 ± 1.5	246.3 ± 10.6	69.3 ± 3.7	158.6 ± 8.5
E4	MeOH	67.3 ± 0.4	238.6 ± 13.3	66.4 ± 4.9	156.8 ± 3.1
E5	DCM	50.3 ± 0.5	273.5 ± 6.8	78.6 ± 2.7	176.0 ± 9.9
E6	mixed solvents	58.6 ± 0.7	281.0 ± 7.1	80.0 ± 1.2	156.0 ± 10.2

^aTotal polyphenol contents were determined by the Folin–Ciocalteu method. The results are expressed as milligram of gallic acid equivalent per gram of extract. ^bFlavone/flavonol contents were determined by AlCl₃ coloration. The results are expressed as milligram of quercetin equivalent per gram of extract. ^cFlavanone/dihydroflavonol contents were determined by the DNP method. The results are expressed as milligram of naringenin equivalent per gram of extract. For all, each value is the mean ± standard deviation (*n* = 3).

C₆H₁₂:EtOAc 90:10 to 80:20 (2.2 L), C₆H₁₂:EtOAc 80:20 to 70:30 (2.5 L), C₆H₁₂:EtOAc 70:30 to 60:40 (2.2 L), C₆H₁₂:EtOAc 60:40 to 50:50 (3.0 L), and at last DCM:MeOH 96:4 (2.2 L). UV detection, achieved at 254 and 280 nm, allowed us to separate 21 fractions.

Scavenging of DPPH Radicals. The diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging evaluations of propolis extracts were carried out using a modified previously established methodology.¹⁸ Tested compounds and standards were diluted in absolute EtOH at 0.02 mg/mL from stock solutions at 1 mg/mL in DMSO. Aliquots (100 μL) of these diluted solutions were placed in 96-well plates in triplicates. The reaction was initiated by adding 25 μL of freshly prepared DPPH solution (1 mM) and 75 μL of absolute EtOH using the microplate reader's injector (Infinite 200, Tecan, France) to obtain a final volume of 200 μL per well. After 30 min in the dark and at room temperature, the absorbance was determined at 517 nm. EtOH was used as a blank, whereas 10, 25, 50, and 75 μM solutions of Trolox (hydrophilic α-tocopherol analog) were used for the calibration curve. A sample of chlorogenic acid ethanolic solution (0.02 mg/mL) was used as the quality control standard. Results were expressed in terms of Trolox equivalents (micromoles of TE per gram of extract).

Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). ORAC assays were carried out according to the method described by Huang et al.¹⁹ with some modifications. The assay was performed in a 96-well plate. The reaction mixture contained 100 μL of 75 mM phosphate buffer (pH 7.4), 100 μL of freshly prepared fluorescein (FL) solution (0.1 μM in phosphate buffer), 50 μL of freshly prepared 2,2'-azobis(2-methylpropanamide) dihydrochloride (AAPH) solution (51.6 mg/mL in phosphate buffer), and 20 μL of sample per well. Samples were analyzed in triplicate and diluted in phosphate buffer at different concentrations (25, 12.5, 6.25, and 3.12 μg/mL) from stock solutions at 1 mg/mL

in DMSO. FL, phosphate buffer, and samples were preincubated at 37 °C for 10 min. The reaction was started by the addition of AAPH using the microplate reader's injector (Infinite 200, Tecan, France). Fluorescence was then measured and recorded during 40 min (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 520 nm). The 75 mM phosphate buffer was used as a blank, and 12.5, 25, 50, and 75 μM solutions of Trolox were used as calibration solutions. A chlorogenic acid solution in phosphate buffer (8.8 μM) was used as quality control standard. The final ORAC values were calculated using a regression equation between the Trolox concentration, and the net area under the FL decay curve and were expressed as micromole of Trolox equivalents per gram of dry matter. Areas under curves were calculated using Magellan data analysis software (Tecan, France).

Determination of Sample Concentrations Inhibiting 50% of AGEs Formation. IC₅₀ values were determined using a previously described method²⁰ with slight modifications. Briefly, BSA (10 mg/mL) was incubated with D-ribose (0.5 M) together with the tested compound (3 μM to 3 mM) or extract (1 μg to 1 mg) in 50 mM phosphate buffer at pH 7.4 (NaN₃, 0.02%). Solutions were incubated in 96-well microtiter plates at 37 °C for 24 h in a closed system before AGE fluorescence measurement. Fluorescence resulting from the incubation, under the same BSA (10 mg/mL) and tested compound (3 μM to 3 mM) or extract (1 μg to 1 mg) conditions, was subtracted for each measurement. A control (i.e., no inhibition of AGEs formation) consisted of wells with BSA (10 mg/mL) and D-ribose (0.5 M). A blank control (i.e., 100% inhibition of AGEs formation) consisted of wells with only BSA. The final assay volume was 100 μL. Pentosidine-like (λ_{exc} 335 nm, λ_{em} 385 nm) AGEs fluorescence was measured using a microplate spectrofluorometer. In this type of automation, a single analysis is sufficient for an accurate IC₅₀ determination.^{20,21} The percentage of AGEs formation was calculated as follows for each compound/extract concentration:

$$\text{AGEs}(\%) = \frac{\text{fluorescence intensity}(\text{sample}) - \text{fluorescence intensity}(\text{blank of sample})}{\text{fluorescence intensity}(\text{control}) - \text{fluorescence intensity}(\text{blank of control})} \times 100$$

Dose–effect curves were best fitted with a sigmoidal dose–response equation using Sigma Plot 12.0 software, which enabled calculation of the IC₅₀ values.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction Yield. As shown in Table 1, the extraction yield of E1 was very low (6.9%), whereas those of the alcoholic extracts E2–E4 were much higher (65–69%). Those of E5 and

E6 were, respectively, 50.3 and 58.6% after a prior cyclohexanic extraction, to remove waxes, which exhibited a 33.0% yield. Thus, yields of E2–E4 were higher than those of EtOH extracts of propolis (EEP) collected in Greece and Cyprus (23.9 to 61.2%).²² These yields were also higher than those observed for 70% EtOH propolis extracts from Bulgaria (58%), Albania (41%), Egypt (18%), Brazil (12–55%)⁵, and a MeOH propolis extract from Mexico (40%).²³

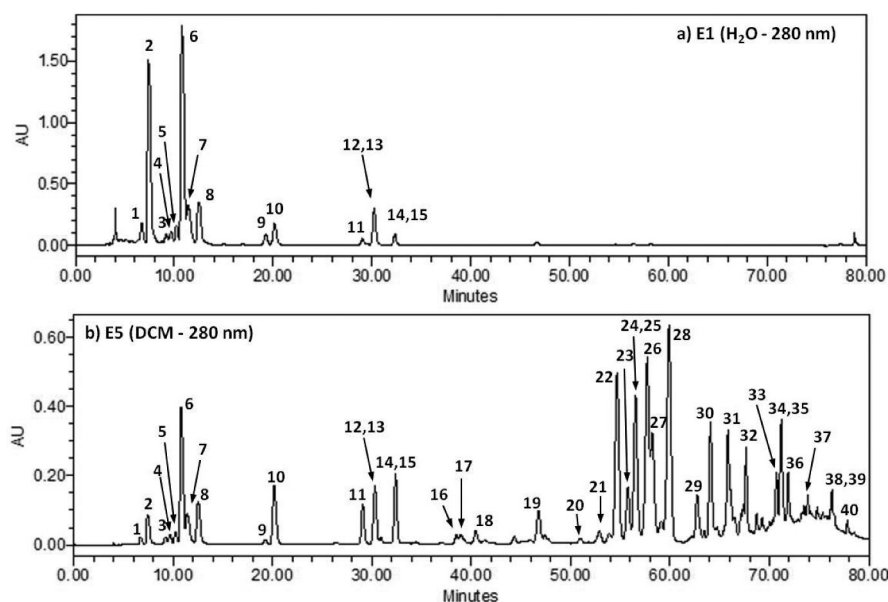


Figure 3. HPLC chromatograms of E1 (a) and E5 (b): 1 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 2 caffeic acid, 3 4-hydroxybenzaldehyde, 4 vanilline, 5 4-hydroxyacetophenone, 6 *p*-coumaric acid, 7 ferulic acid, 8 isoferulic acid, 9 benzoic acid, 10 3,4-dimethoxycinnamic acid, 11 pinobanksin-5-methyl ether, 12 cinnamic acid, 13 4-methoxycinnamic acid, 14 pinobanksin, 15 naringenin, 16 1,3-dicoumaroylglycerol, 17 kaempferol, 18 apigenin, 19 cinnamylidene acetic acid, 20 rhamnetin, 21 pinocembrin-5-methyl ether, 22 pinocembrin, 23 isopent-3-enyl caffeate, 24 benzyl caffeate, 25 2-acetyl-1,3-dicoumaroylglycerol, 26 pinobanksin-3-acetate, 27 prenyl caffeate, 28 chrysin, 29 caffeic acid phenylethyl ester (CAPE), 30 galangin, 31 benzyl *p*-coumarate, 32 cinnamyl caffeate, 33 pinostrobin, 34 cinnamyl isoferulate, 35 cinnamyl *p*-coumarate, 36 tectochrysin, 37 alpinone-3-acetate, 38 benzyl cinnamate, 39 cinnamyl cinnamate, 40 cinnamyl cinnamylidene acetate.

Table 2. Contents of the 12 Markers in Propolis Extracts (E1–E6)

	content ^a (mg/g of extract)					
	E1: H ₂ O	E2: 95% EtOH	E3: 70% EtOH	E4: MeOH	E5: DCM	E6: mixed solvents
caffeic acid (2)	76.9 ± 0.6	6.9 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.6 ± 0.1	5.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
<i>p</i> -coumaric acid (6)	61.4 ± 0.3	10.7 ± 0.1	11.1 ± 0.1	10.2 ± 0.1	15.4 ± 0.1	12.0 ± 0.1
ferulic acid (7)	20.8 ± 0.4	4.1 ± 0.1	4.4 ± 0.1	3.9 ± 0.1	6.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1
isoferulic acid (8)	16.2 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1	6.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1
3,4-dimethoxy-cinnamic acid (10)	9.9 ± 0.1	7.7 ± 0.1	7.7 ± 0.1	7.1 ± 0.1	10.8 ± 0.1	7.7 ± 0.1
pinocembrin (22)	N.D.	35.2 ± 0.2	33.4 ± 0.2	33.0 ± 0.2	49.6 ± 0.4	36.8 ± 0.3
pinobanksin-3-acetate (26)	N.D.	40.2 ± 0.3	38.7 ± 0.5	38.1 ± 0.2	59.1 ± 0.5	42.8 ± 0.4
prenyl caffeate (27)	N.D.	20.2 ± 0.5	20.2 ± 0.3	19.5 ± 0.2	27.4 ± 0.3	22.0 ± 0.4
chrysin (28)	N.D.	24.7 ± 0.1	23.5 ± 0.2	23.1 ± 0.2	36.5 ± 0.4	27.6 ± 0.2
CAPE (29)	N.D.	11.2 ± 0.2	10.6 ± 0.2	10.4 ± 0.4	15.8 ± 0.7	11.8 ± 0.2
galangin (30)	N.D.	21.9 ± 0.2	20.7 ± 0.3	20.4 ± 0.5	31.1 ± 0.8	23.5 ± 0.4
pinostrobin (33)	N.D.	10.7 ± 0.1	12.9 ± 0.3	10.0 ± 0.2	8.1 ± 0.4	7.8 ± 0.3
total	185.3 ± 1.5	195.3 ± 1.1	193.7 ± 1.8	186.5 ± 1.8	271.6 ± 3.5	208.9 ± 2.4

^aEach value is the mean of triplicate analyses ± standard deviation. N.D. = not detected.

Total Polyphenol Content. Total polyphenol (TP) contents (Table 1) were high for E1–E6, in a range of 238.6 to 292.1 mg GAE/g. This is in accordance with values observed for European and Asian poplar-type propolis (≈200–300 mg GAE/g).¹ Best TP contents were observed for E1, E5, and E6. E2 (253.6 mg GAE/g) had a similar value to EEP from Ukraine (255 mg GAE/g) and United States (256 mg GAE/g) but higher than the ones found in Hungary (242 mg GAE/g), Bulgaria (220 mg GAE/g), Argentina (212 mg GAE/g), Uzbekistan (174 mg GAE/g), Brazil (120 mg GAE/g), South Africa (100 mg GAE/g), and Thailand (31 mg GAE/g).¹

Flavone/Flavonol and Flavanone/Dihydroflavonol Contents. As indicated in Table 1, E1 showed the lowest flavone/flavonol (FF) and flavanone/dihydroflavonol (FD) contents (respectively, 21 mg QE/g and 77 mg NE/g), whereas

FF contents of the other extracts were in a range of 66–80 mg QE/g and FD contents in a range of 153–176 mg NE/g, E5 and E6 showing the best values. For all extracts, FD was superior to FF contents. Alcoholic extracts E2–E4 had similar values (66–69 mg QE/g for FF and 153–159 mg NE/g for FD contents), which appeared superior to those of propolis from Northeastern Spain (≈48.2 mg/g for FF and 78.8 mg/g for FD).² They seem closer to those of EEP from Pueblo de Alamos in Northwestern Mexico (57.8 mg/g for FF and 150.6 mg/g for FD content).²⁴ Nevertheless, FF and FD contents of E2–E4 differed from those of Italian and Swiss 70% EtOH propolis extracts where FF > FD.²⁵

Identification of Components by HPLC Analysis with DAD and MS Detection. Figure 3 shows the HPLC chromatograms of E1 and E5, the profiles of E2–E4 and E6

Table 3. Antioxidant and Anti-AGEs Activities of Propolis Extracts (E1–E6)

extract/compd	solvent	DPPH ^a ($\mu\text{mol TE/g}$)	ORAC ^a ($\mu\text{mol TE/g}$)	anti-AGEs ^b IC ₅₀ (mg/mL)
E1	H ₂ O	1731 \pm 28	9722 \pm 273	0.34
E2	EtOH	1605 \pm 26	8155 \pm 114	0.05
E3	70% EtOH	1650 \pm 149	9890 \pm 480	0.03
E4	MeOH	1386 \pm 171	7769 \pm 360	0.03
E5	DCM	1437 \pm 105	9242 \pm 739	0.03
E6	mixed solvents	1964 \pm 124	11278 \pm 11	0.04
propolis (Greece) ^c	EtOH	1110 \pm 70	N.D.	N.D.
propolis (Colombia) ^d	EtOH	190	1965	N.D.
E392 ^e	EtOH	591 \pm 20	2433 \pm 88	0.60
<i>S. japonicum</i> ^f	EtOH	1714 \pm 68	7896 \pm 711	0.09
chlorogenic acid		2740 \pm 64	11289 \pm 531	0.04
quercetin		6723 \pm 66	13907 \pm 662	0.06

^aDPPH and ORAC results are expressed as micromoles of Trolox equivalent per gram of extract. For both, each value is the mean \pm standard deviation ($n = 3$). ^bAnti-AGEs activity is evaluated by the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) expressed as milligram per milliliter (mg/mL) ($n = 1$). ^c(Kalogeropoulos et al., 2009). ^d(Rodríguez et al., 2012). ^e*Rosmarinus officinalis*. ^f*Styphnolobium japonicum*. N.D. = not determined.

(not shown) being very similar to E5. As expected with differences in solvent polarities, we observed two profile types: the aqueous type with retention times ranging from 6 to 33 min and the organic one, with retention times of most compounds ranging from 10 to 72 min. Chemical profiling was achieved by comparison with literature data (UV/MS), using pure standards or, when needed, after isolation through ¹H and ¹³C (1D and 2D) NMR analysis. These studies allowed us to identify 40 compounds as benzaldehyde, benzoic, and cinnamic acid derivatives and their ester, glycerols, and different classes of flavonoids (flavones, flavonols, flavanones, and dihydroflavonols). E1 contained benzaldehyde and benzoic acid derivatives (1, 3–5, 9), cinnamic acid derivatives (2, 6–8, 10, 12, 13) and some flavanones/dihydroflavonols (11, 14, 15). E5 exhibited the same compounds, in less quantities, added with cinnamylidene acetic acid 19, cinnamic ester derivatives (23, 24, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 38–40), glycerol derivatives (16, 25), and other flavonoids, as flavanones/dihydroflavonols (21, 22, 26, 33, 36), flavones/flavonols (17, 18, 20, 28, 30, 37). So, mainly exhibiting cinnamic acid derivatives (caffeic and *p*-coumaric acids...) and their esters (prenyl caffeate, CAPE...), and flavonoids (pinocembrin, pinobanksin-3-acetate, chrysin, galangin...), this French propolis clearly belongs to the poplar type with polyphenols originating from *Populus* spp. of section *Aigeiros* and especially *P. nigra* L.^{7,26}

Quantification of 12 Major Compounds. Results of the quantitative analysis of E1–E6 are given in Table 2. As already outlined in Figure 2a, E1 contained mainly phenolic acids with a majority of caffeic 2 and *p*-coumaric 6 acids with 76.9 \pm 0.6 and 61.4 \pm 0.3 mg/g, respectively. In E2–E6, pinobanksin-3-acetate 28 appeared as the major component, followed by pinocembrin 25, chrysin 32, galangin 34, and prenyl caffeate 29. Taken as a whole, the higher cumulative amount of these 12 components was observed for E5 with 271.6 \pm 3.5 mg/g, whereas the lowest indexes were associated with E4 and E1 (186 and 185.3 mg/g, respectively). For the aqueous extract (E1), it can be noticed that this amount corresponded to only five detectable markers (phenolic acids). Therefore, the quantification results were in accordance with our total polyphenol and flavonoid contents (Table 1). The same three major compounds were also observed in different proportions with poplar type propolis from China (chrysin \gg pinocembrin $>$ pinobanksin-3-acetate), Hungary (chrysin \gg

pinobanksin-3-acetate $>$ pinocembrin), and Uruguay (pinobanksin-3-acetate $>$ chrysin $>$ pinocembrin).¹

Antioxidant and Anti-AGEs Activities. AO and anti-AGEs activities observed for E1–E6 are shown in Table 3. E1–E6 are compared with specific references (extract or pure compounds) on the one hand and literature data on the other hand. E392 is an ethanolic rosemary extract used as an AO food additive in Europe (Official Journal of European Union, Directive 2010/67/UE, L 277/17). It should be noticed that, at least in our survey, E392 only showed very weak activities. As expected, E1 exhibited good AO activities but, lacking flavonoids, no real antiglycation potential. At the opposite, E6 showed very good overall activities due to a comprehensive polyphenol extraction. However, as far as anti-AGEs activity was concerned, similar results were obtained with E3–E5. Therefore, from a food additive point of view, a mother tincture such as E3, exhibiting fair AO activities associated with a true anti-AGEs potential, appears as quite interesting. According to its very good anti-AGEs activity (IC₅₀ = 0.03 mg/mL), combined with the best cumulative content of the 12 quantified markers (272 mg/g), E5 was chosen for a bioguided fractionation by Flash chromatography.

Anti-AGEs Guided Fractionation of E5. Among 21 fractions (F) issued from the flash chromatography, F1–F5 did not exhibit any activity (IC₅₀ $>$ 1 mg/mL), whereas the IC₅₀ values for F6–21 were in a range of 0.01 to 0.13 mg/mL. Eight fractions showing IC₅₀ \leq 0.04 mg/mL (namely, F8–F12 and F16–F18, i.e., F8:0.02; F9:0.04; F10:0.01; F11:0.03; F12:0.03; F16:0.03; F17:0.03 and F18:0.04 mg/mL) were then selected for a chemical profiling, and the anti-AGEs activities of purified components were finally achieved (Table 4). The 16 analyzed compounds can be divided into three groups. The first one contained the most active components in our assay, with IC₅₀ \leq 0.10 mM (i.e., in decreasing order, pinobanksin-3-acetate 26, 2-acetyl-1,3-dicoumaroylglycerol 25, pinobanksin 14, prenyl caffeate 27 and pinobanksin-5-methyl ether 11) The second group was composed of moderately anti-AGEs compounds (0.2 \leq IC₅₀ \leq 1.6 mM) like naringenin 15, caffeates 24, 38 and 29, ferulic and isoferulic acids 7 and 8, and ester 34. The last group exhibited non active molecules (IC₅₀ $>$ 3 mM) like *p*-coumaric and cinnamic acids 6 and 12 as well as chrysin 28. Thus, among the most active components, three of them were pinobanksin derivatives (flavanones 26, 14, and 11). Besides, a trisubstituted

Table 4. Anti-AGEs Activities of Compounds Present in the Eight Selected Fractions (with $IC_{50} \leq 0.04$ mg/mL)

compd (no.)	anti-AGEs ^a IC_{50} (mM)	fraction
pinobanksin-3-acetate (26)	0.06	F8
2-acetyl-1,3-dicoumaroylglycerol (25)	0.07	F17
pinobanksin (14)	0.08	F9
prenyl caffeate (27)	0.09	F10
pinobanksin-5-methyl ether (11)	0.10	F18
naringenin (15)	0.2	F11–F12
benzyl caffeate (24)	0.4	F11
cinnamyl caffeate (38)	0.5	F11
cinnamyl isoferulate (34)	0.6	F8
ferulic acid (7)	0.7	F16
isoferulic acid (8)	0.9	F18
CAPE (29)	1.6	F11
<i>p</i> -coumaric acid (6)	>3	F16
cinnamic acid (12)	>3	F9
chrysin (28)	>3	F9

^aThe anti-AGEs activity was evaluated by the means of the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) expressed as millimole of compound per liter (mM) ($n = 1$). Reference: quercetin $IC_{50} = 0.2$ mM.

glycerol (25) and a prenylated caffeate (27) also appeared as good glycation inhibitors.

There is nowadays a growing interest in compounds exhibiting antiglycation combined with antioxidant properties. However, if a fair anti-AGEs activity is expected from any AO compound (Figure 1), the measured effect may be deceptive, at least because glycation spontaneously occurs so that AO must exhibit long lifetimes. Indeed, whereas coincubation of methylglyoxal (MGO) and reduced glutathione or Trolox totally prevents ROS production, it only partially prevents the MGO-induced decrease of brain cell viability.²⁷ A contrario, an AO synthetic compound such as aminosalicic acid proved in vitro more effective than aminoguanidine in reducing the antiproliferative effects of both high glucose and BSA-issued AGEs.²⁸ One may then turn to natural AO, especially in the search for compounds exhibiting low toxicities. As a food ingredient used from ancient times with very high AO activity, it was therefore of great interest to evaluate the antiglycation potential of our propolis batch. Our study actually demonstrates that a mother tincture of propolis such as E3 represents a very good candidate for further food development.

Bioactive compound may also act by blocking the interaction between AGEs and their specific receptors (i.e., RAGEs). As far as neurodegeneration is concerned, it was recently demonstrated that inhibiting the upregulation of RAGEs transcripts, pinocembrin (22), a major component in E2–E6 extracts, truly improved cognitive function, preserved the ultrastructural neuropil, and decreased the neurodegeneration of the cerebral cortex in amyloid- β -peptide-treated mice.²⁹ All in all, a poplar type propolis like this French batch have therefore great potential to be used as food additive to prevent glycoxidation.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

Chemical structures of the identified compounds with their UV/MS data and the anti-AGEs guided fractionation of E5. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: pascal.richomme@univ-angers.fr. Fax: +33 241226634. Tel.: +33 241226667.

Funding

This study was financed by Ballot-Flurin Apiculteurs Cie. There is no other competing interest.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Isabelle Péruchès, from Ballot-Flurin Apiculteurs who provided propolis samples and Dr. Ingrid Freuze from the “Plateforme d’Ingénierie et Analyses Moléculaires” (PIAM), University of Angers, for MS analyses.

■ ABBREVIATION USED

AGEs: advanced glycation end-products; AO: antioxidant; APCI: atmospheric pressure chemical ionization; BSA: bovin serum albumin; DCM: dichloromethane; DPPH: diphenylpicrylhydrazyl; DNP: 2,4-dinitrophenylhydrazine; ESI: electrospray ionization; FD: flavanone/dihydroflavonol; FF: flavone/flavonol; HPLC/DAD: high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector; MGO: methylglyoxal; NMR: nuclear magnetic resonance; ORAC: oxygen radical absorbance capacity; RAGEs: receptor for advanced glycation end-products; ROS: reactive oxygen species; TP: total polyphenol

■ REFERENCES

- (1) Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Bang, K.-S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7286–7292.
- (2) Bonvehí, J.; Gutiérrez, A. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1387–1395.
- (3) Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia* **2002**, *73* (Supplement 1), S1–S6.
- (4) Popova, M.; Silici, S.; Kaftanoglu, O.; Bankova, V. Antibacterial Activity of Turkish Propolis and Its Qualitative and Quantitative Chemical Composition. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 221–228.
- (5) Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, Antifungal, and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64*, 235–240.
- (6) Bankova, V.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie* **2000**, *31*, 3–15.
- (7) Bankova, V. Chemical Diversity of Propolis and the Problem of Standardization. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 114–117.
- (8) Ahmed, N. Advanced Glycation Endproducts—Role in Pathology of Diabetic Complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2005**, *67*, 3–21.
- (9) Takeuchi, M.; Yamagishi, S. Possible Involvement of Advanced Glycation End-Products (AGEs) in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 973–978.
- (10) Jandeleit-Dahm, K.; Cooper, M. E. The Role of AGEs in Cardiovascular Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 979–986.
- (11) Miyata, T.; Iida, Y.; Horie, K.; Cai, Z.; Sugiyama, S.; Maeda, K. Pathophysiology of Advanced Glycation End-Products in Renal Failure. *Nephrol. Dial., Transplant.* **1996**, *11*, 27–30.
- (12) Yoo, N. H.; Jang, D. S.; Yoo, J. L.; Lee, Y. M.; Kim, Y. S.; Cho, J.-H.; Kim, J. S. Erigeronflavanone, a Flavanone Derivative from the Flowers of *Erigeron Annuus* with Protein Glycation and Aldose Reductase Inhibitory Activity. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 713–715.

- (13) Hegazi, A. G.; Abd El Hady, F. K.; Abd Allah, F. A. M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. *Z. Naturforsch.* **2000**, *55c*, 70–75.
- (14) De Castro Ishida, V. F.; Negri, G.; Salatino, A.; Bandeira, M. F. C. L. A New Type of Brazilian Propolis: Prenylated Benzophenones in Propolis from Amazon and Effects against Cariogenic Bacteria. *Food Chem.* **2011**, *125*, 966–972.
- (15) Rebiai, A.; Lanez, T.; Belfar, M. L. In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity of Algerian Propolis by Spectrophotometrical and Electrochemical Assays. *Int. J. Pharmacol.* **2011**, *7*, 113–118.
- (16) Woisky, R. G.; Salatino, A. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *J. Agric. Res.* **1998**, *37*, 99–105.
- (17) Nagy, M.; Grancai, D. Colorimetric Determination of Flavanones in Propolis. *Pharmazie* **1996**, *51*, 100–101.
- (18) Abdel-Lateff, A.; König, G. M.; Fisch, K. M.; Höller, U.; Jones, P. G.; Wright, A. D. New Antioxidant Hydroquinone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Acremonium* Sp. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1605–1611.
- (19) Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Prior, R. L. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4437–4444.
- (20) Séro, L.; Sanguinet, L.; Blanchard, P.; Dang, B. T.; Morel, S.; Richomme, P.; Séraphin, D.; Derbré, S. Tuning a 96-Well Microtiter Plate Fluorescence-Based Assay to Identify AGE Inhibitors in Crude Vegetal Extracts. *Molecules* in press.
- (21) Derbré, S.; Gatto, J.; Pelleray, A.; Coulon, L.; Séraphin, D.; Richomme, P. Automating a 96-Well Microtiter Plate Assay for Identification of AGEs Inhibitors or Inducers: Application to the Screening of a Small Natural Compounds Library. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1747–1758.
- (22) Kalogeropoulos, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtzinos, I.; Karathanos, V. T. Chemical Composition, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Propolis Extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem.* **2009**, *116*, 452–461.
- (23) Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Esumi, H.; Kadota, S. Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 623–627.
- (24) Velazquez, C.; Navarro, M.; Acosta, A.; Angulo, A.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Robles-Zepeda, R.; Lugo, E.; Goycoolea, F. M.; Velazquez, E. F.; Astiazaran, H.; Hernandez, J. Antibacterial and Free-Radical Scavenging Activities of Sonoran Propolis. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 1747–1756.
- (25) Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A. G.; Marcuzzan, G. L.; Bogdanov, S. Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 235–240.
- (26) Rubiolo, P.; Casetta, C.; Cagliero, C.; Brevard, H.; Sgorbini, B.; Bicchi, C.; Populus Nigra, L. Bud Absolute: A Case Study for a Strategy of Analysis of Natural Complex Substances. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 1223–1235.
- (27) Heimfarth, L.; Loureiro, S. O.; Pierozan, P.; Lima, B. O.; de Reis, K. P.; Torres, E. B.; Pessoa-Pureur, R. Methylglyoxal-Induced Cytotoxicity in Neonatal Rat Brain: A Role for Oxidative Stress and MAP Kinases. *Metab. Brain Dis.* **2013**, *28*, 429–438.
- (28) Duraisamy, Y.; Gaffney, J.; Slevin, M.; Smith, C. A.; Williamson, K.; Ahmed, N. Aminosalicic Acid Reduces the Antiproliferative Effect of Hyperglycaemia, Advanced Glycation Endproducts and Glycated Basic Fibroblast Growth Factor in Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells: Comparison with Aminoguanidine. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *246*, 143–153.
- (29) Liu, R.; Wu, C.; Zhou, D.; Yang, F.; Tian, S.; Zhang, L.; Zhang, T.; Du, G. Pinocembrin Protects against B-Amyloid-Induced Toxicity in Neurons through Inhibiting Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-Independent Signaling Pathways and Regulating Mitochondrion-Mediated Apoptosis. *BMC Medicine* **2012**, *10*, 105.

Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis

Séverine Boisard^a, Anne-Marie Le Ray^a, Julia Gatto^a, Marie-Christine Aumond^a,
Patricia Blanchard^a, Séverine Derbré^a, Catherine Flurin^b, Pascal Richomme^a

^a EA 921 SONAS/SFR 4207 QUASAV, Université d'Angers, 16 Boulevard Daviers, 49045 Angers cedex 01, France

^b Ballot-Flurin Apiculteurs, La Miellerie, Chemin de Balas, 65700 Lahitte-Toupière, France

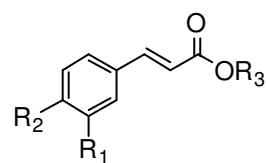
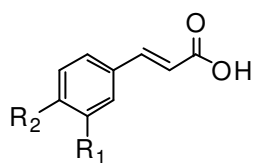
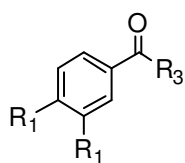
SUPPORTING INFORMATION

List of supporting information

Fig. SI-1. Chemical structures of compounds present in the propolis extracts

Table SI-1. Composition of the propolis batch with UV/MS data for 40 identified constituents

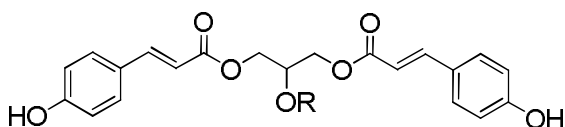
Fig. SI-2. Anti-AGEs guided fractionation of the DCM extract (E5)



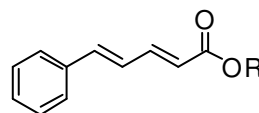
	R ₁	R ₂	R ₃
1	OH	OH	H
3	H	OH	OH
4	OMe	OH	H
5	H	OH	Me
9	H	H	OH

	R ₁	R ₂
2	OH	OH
6	H	OH
7	OMe	OH
8	OH	OMe
10	OMe	OMe
12	H	H
13	H	OMe

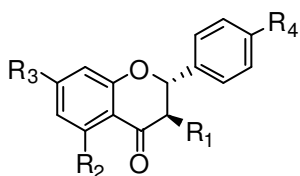
	R ₁	R ₂	R ₃
23	OH	OH	(CH ₂) ₂ C(CH ₃)=CH ₂
24	OH	OH	CH ₂ Ph
27	OH	OH	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂
29	OH	OH	(CH ₂) ₂ Ph
31	H	OH	CH ₂ Ph
32	OH	OH	CH ₂ CH=CHPh
34	OH	OMe	CH ₂ CH=CHPh
35	H	OH	CH ₂ CH=CHPh
38	H	H	CH ₂ Ph
39	H	H	CH ₂ CH=CHPh



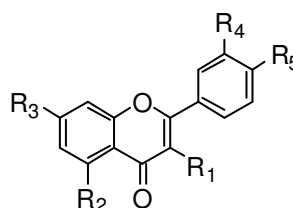
	R
16	H
25	COCH ₃



	R
19	H
40	CH ₂ CH=CHPh



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
11	OH	OMe	OH	H
14	OH	OH	OH	H
15	H	OH	OH	OH
21	H	OMe	OH	H
22	H	OH	OH	H
26	OCOMe	OH	OH	H
33	H	OH	OMe	H
36	OCOMe	OH	OMe	H



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
17	OH	OH	OH	H	OH
18	H	OH	OH	H	OH
20	OH	OH	OMe	OH	OH
28	H	OH	OH	H	H
30	OH	OH	OH	H	H
37	H	OH	OMe	H	H

Fig. SI-1. Chemical structures of compounds present in the propolis extracts

Table SI-1. Composition of the propolis batch with UV/MS data for 40 identified constituents

Pic n°	Compound	tr (min)	UV λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	Adduct and/or fragmentation	*
1	3,4-Dihydroxybenzaldehyde	6.7	280,312	137 / 139	102	b
2	Caffeic acid	7.4	299, 325	179 / -	163 [M+H-H ₂ O]	a,b
3	4-Hydroxybenzaldehyde	9.2	284	121 / -		b,c
4	Vanilline	9.7	281, 311	- / 153		a,b,c,e
5	4-Hydroxyacetophenone	10.2	278	135 / 137	102	c
6	<i>p</i> -Coumaric acid	10.8	310	163 / -	147 [M+H-H ₂ O]	a,b
7	Ferulic acid	11.4	298, 323	193 / -	177 [M+H-H ₂ O]	a,b
8	Isoferulic acid	12.5	298, 323	193 / -	177 [M+H-H ₂ O]	a,b,c
9	Benzoic acid	19.3	230, 274	121 / 123	102	a,b,c
10	3,4-Dimethoxycinnamic acid	20.2	298, 323	207 / -	191 [M+H-H ₂ O], 163	a,b,c
11	Pinobanksin-5-methyl ether	29.1	288	285 / -	309 [M+Na]	b,c
12	Cinnamic acid	30.3	277	147 / -	131 [M+H-H ₂ O]	a,b,c
13	4-Methoxycinnamic acid	30.3	308	177 / -	161 [M+H-H ₂ O]	b
14	Pinobanksin	32.4	291, 330sh	271 / 273	295 [M+Na]	b,c
15	Naringenin	32.4	289, 330sh	271 / 273		a,b,c
16	1,3-Dicoumaroylglycerol	38.5	298, 314	383 / -		c
17	Kaempferol	39.0	266, 364	285 / -		b
18	Apigenin	40.5	268, 337	269 / -		b
19	Cinnamylidene acetic acid	46.8	311	173 / 175	157 [M+H-H ₂ O]	b
20	Rhamnetin	51.0	256, 372	315 / 317	302 [M+H-CH ₃]	b
21	Pinocembrin-5-methyl ether	52.9	288, 330sh	269 / -	293 [M+Na]	c
22	Pinocembrin	54.7	288, 328sh	255 / 257		b,c
23	Isopent-3-enyl caffeate	55.8	299, 329	247 / -	271 [M+Na]	b,c
24	Benzyl caffeate	56.5	299, 329	269 / -		b,c
25	2-Acetyl-1,3-dicoumaroylglycerol	56.5	316	425 / -		b,c
26	Pinobanksin-3-acetate	57.7	293, 330sh	313 / -	337 [M+Na]	b,c
27	Prenyl caffeate	58.2	299, 329	247 / -	271 [M+Na]	a,b,c
28	Chrysin	59.9	268, 314sh	253 / 255	277 [M+Na]	a,b,c
29	Phenylethyl caffeate (CAPE)	62.7	299, 329	283 / -		a,b,c
30	Galangin	64.1	265, 312sh, 358	269 / -		b
31	Benzyl <i>p</i> -coumarate	65.8	314	253 / -		b,c
32	Cinnamyl caffeate	67.6	298, 329	295 / -		b,c
33	Pinostrobin	70.7	290, 328sh	- / 271	293 [M+Na]	b,c
34	Cinnamyl isoferulate	71.2	293, 326	309 / -	333 [M+Na]	b,c,e
35	Cinnamyl <i>p</i> -coumarate	71.2	311	279 / -		b,c
36	Tectochrysin	71.9	271, 311sh	- / 269	291 [M+Na]	b,c
37	Alpinone-3-acetate	73.9	293, 330sh	- / 329		b,c
38	Benzyl cinnamate	76.3	281	- / -	261 [M+Na]	b,c
39	Cinnamyl cinnamate	76.5	258, 275	- / -	287 [M+Na]	b,c
40	Cinnamyl cinnamylidene acetate	77.8	313	- / -	313 [M+Na]	c

* Identification of constituents confirmed, in addition to UV and MS data, with a: standard, b: references, c: 1D NMR (¹H and/or ¹³C), d: 2D NMR (COSY, HMQC, HMBC), e: 2D NMR (NOESY)

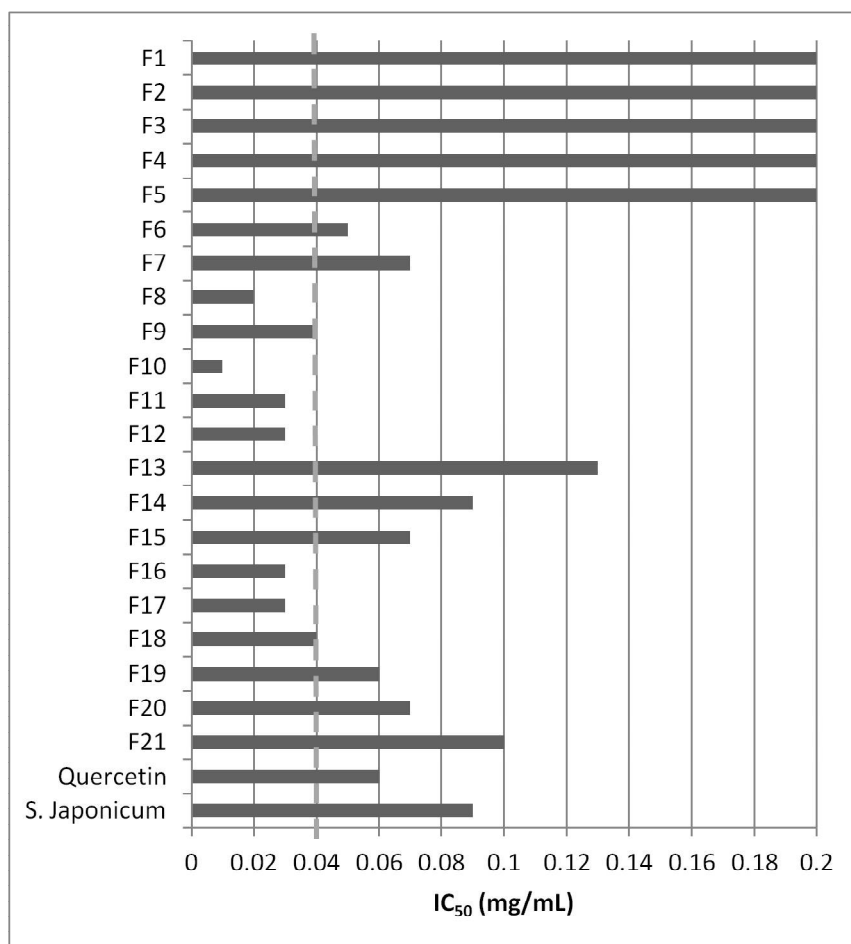


Fig. SI-2. Anti-AGEs guided fractionation of the DCM extract (E5)

Unusual chemical composition of a Mexican propolis collected in Quintana Roo, Mexico

Séverine Boisard,^a Thi Huong Tho Huynh,^a Fabiola Escalante-Erosa,^b Luis
Ignacio Hernández-Chavez,^c Luis Manuel Peña-Rodríguez,^b and Pascal
Richomme^{a,*}

^aEA 921 SONAS/SFR 4207 QUASAV, Université d'Angers, 16 Bd Daviers, 49045 Angers Cedex 01, France

^bUnidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

^cInstituto Superior de Felipe Carrillo Puerto, Carrillo Puerto Quintana Roo, México

Acceptée dans “*Journal of Apicultural Research*” le 23 juillet 2014 sous la
référence JAR1410AA

* Corresponding author : pascal.richomme@univ-angers.fr

SUMMARY

Propolis is a resinous natural substance collected by honeybees from buds and exudates of various trees and plants; it is widely accepted that the composition of propolis depends on the phytogeographic characteristics of the site of collection. In this study we have analyzed the chemical composition of a propolis collected in Quintana Roo, Mexico, and evaluated its antioxidant, antifungal and antibacterial activities. Unexpectedly, the chemical analysis showed that the main components of the ethanolic extract of a Mexican propolis appeared to be pentacyclic triterpenoids, such as α and β -amyrin derivatives, and sterols. The crude extract did not show antioxidant activity when tested using the DPPH-reduction assay, and it also proved inactive when tested for antifungal and antibacterial activities using microdilution and agar diffusion assays, respectively. The fact that the presence of both α and β -amyryns and their derivatives have been reported from the resin of *Bursera simaruba*, one of the plants used by the bees for propolis production in Quintana Roo, Mexico, confirms the relationship that exists between the flora available to bees in a given region and the chemical composition of the propolis that they produce.

RESUMEN

El propóleo es un producto natural resinoso colectado por abejas a partir de brotes y exudados de diferentes plantas y árboles; es ampliamente aceptado que la composición del propóleo depende de las características fitogeográficas del sitio de colecta. En este estudio analizamos la composición química de un propóleo colectado en Quintana Roo, México, y evaluamos sus actividades antioxidante, antifúngica y antibacteriana. Inesperadamente, el análisis químico mostró que los principales componentes del extracto etanólico del propóleo mexicano parecían ser triterpenoides pentacíclicos, tales como derivados de α y β -amyrina y esteroides. El extracto crudo no mostró actividad antioxidante al ser evaluado en el ensayo de reducción de DPPH, y también se mostró inactivo al ser evaluado en cuanto a su actividad antifúngica y antibacteriana utilizando los ensayos de microdilución y de difusión en agar, respectivamente. El hecho de que la presencia de α y β -amyrina y sus derivados ya se ha reportado en la resina de *Bursera simaruba*, una de las plantas utilizadas por las abejas para su producción de propóleo en Quintana Roo, México, confirma la relación que existe entre la flora disponible para las abejas en una región en particular y la composición química del propóleo que producen.

Keywords: Mexican propolis, pentacyclic triterpenes, amyryns, sterols, *Bursera simaruba*

Short title: Chemical composition of a Mexican propolis

INTRODUCTION

Propolis is a resinous natural substance collected by honeybees from buds and exudates of various trees and plants, mixed with beeswax and salivary enzymes. Bees generally use propolis to seal and smooth out the internal walls of the hive, as well as a protective barrier against fungal and bacterial infections. Propolis has been used in folk medicine since ancient times due to its pharmacological potential associated with antioxidant (Cottica *et al.* 2011; Gülçin *et al.* 2010; Miguel *et al.* 2010), antifungal (Ota *et al.* 2001; Sawaya *et al.* 2002), antibacterial (Kujumgiev *et al.* 1999; Popova *et al.* 2005; Raghukumar *et al.* 2010) and anti-inflammatory (Castaldo and Capasso, 2002) properties.

Propolis is generally composed of 50% resin and balm (including polyphenolic compounds), 30% wax and fatty acids, 10% essential oils, 5% pollen and 5% various organic and inorganic compounds. Presently it is widely accepted that the composition of propolis depends on the phytogeographic characteristics of the site of collection (Marcucci, 1995; Sforcin and Bankova, 2011) and a number of attempts have been made to define propolis types taking into account geographic origin, chemical composition, and plant source (Park *et al.* 2002; Salatino *et al.* 2005; Sforcin and Bankova, 2011; Trusheva *et al.* 2006); recently, five propolis types have been defined according to their chemogeographic patterns (Salatino *et al.* 2011). It is also generally accepted that propolis from temperate climatic zones, like Europe, North America and non-tropical regions of Asia, originate mainly from the bud exudates of *Populus* species and are rich in flavonoids, phenolic acids and their esters (Bankova *et al.* 2000), while propolis from tropical regions, where no poplars and birches exist, are rich in prenylated derivatives of *p*-coumaric acid and benzophenones (Bankova, 2005a; Kumazawa *et al.* 2004; Sforcin and Bankova, 2011); other examples include lignan-containing propolis from Chile, Spain and Kenya, and a propolis from Myanmar containing cycloartanes and prenylated flavanones (Salatino *et al.* 2011).

Mexico is considered as one of the three most important honey exporters in the world, with around 40% of its production located in and around the Yucatan peninsula (Pino *et al.* 2006). However, in spite of its potential importance, studies on the chemical composition and biological activity of Mexican propolis are limited. A chemical investigation of a red propolis sample collected in Campeche, in the southeast region of Mexico, reported the presence of flavanones, isoflavans and pterocarpanes, suggesting a possible relationship between the chemical composition of the Mexican red propolis and plants of the *Dalbergia* genus (Lotti *et al.* 2010). Other investigations report the antimicrobial activity against gram negative bacteria of several propolis samples collected in Campeche, Mexico (Tolosa and Canizares, 2002), the correlation between antimicrobial activity and composition of propolis and plants collected in central Mexico (Londono Orozco *et al.* 2010), and the identification by GC-MS of over 100 volatile constituents from two propolis samples collected in Yucatan, Mexico (Pino *et al.* 2006). Finally, a study on the chemical composition and biological activity of three propolis samples collected in different arid and semiarid regions of Sonora, Mexico showed cinnamic and phenylpropanoic acid derivatives and flavonoids as the main components, and antibacterial, free-radical scavenging, and cytotoxic activities (Li *et al.* 2010; Velazquez *et al.* 2007). We wish to report herein on the evaluation of the antioxidant, antifungal and antibacterial activities of a tropical propolis sample from Quintana Roo, a state in the Yucatan

peninsula of Mexico, and the unexpected identification of pentacyclic triterpenoids and sterols as the only components present in its ethanolic extract.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu reagent, formic acid, and gallic acid, all analytical grade, were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox[®]) and 5'-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) were obtained from Acros Organics (Geel, Belgium).

Propolis sample. The propolis sample (224 g), collected from apiaries located in the area of Macario Gómez in Solidaridad, Quintana Roo, Mexico, was obtained from the Dzidzilche honey-distributing store of the "Productores y Realizadores de Miel Maya" cooperative.

Extractions. Propolis was first pulverized in the presence of liquid nitrogen into a homogenous powder. A 1 g portion of propolis powder was extracted three times with ethanol (20 mL) at room temperature for 2 h; the combined filtrates were maintained at -18°C overnight, filtered to remove waxes, and evaporated under reduced pressure to dryness to give the ethanolic extract (**E1a**). A second 1 g portion of propolis was successively extracted with cyclohexane (**E2**, 3x20 mL, 2h), DCM (**E3**, 3x10 mL, 2h), EtOAc (**E4**, 3x10 mL, 2h), and MeOH (**E5**, 3x10mL, 2h) to produce the corresponding low, medium low, medium high, and high polarity extracts.

Determination of total polyphenol content. Total polyphenol content was determined according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method (Rebiai *et al.* 2011); 20 µL of extract solution (2.5 mg/mL) in MeOH were mixed with 280 µL of distilled water and 100 µL of Folin-Ciocalteu's phenol reagent. After 3 min, 1200 µL of distilled water and 400 µL of 20% aqueous sodium carbonate solution were added and 200 µL of each solution were put into a 96-well microtiter plate. A blank was prepared in the same way by using MeOH instead of the extract solution. The absorbance was measured on a Tecan Infinite M200 microplate spectrophotometer, at 760 nm after 30 min in the dark, at room temperature. Gallic acid was used to calculate the calibration curve (0.4-1.2 mg/mL; $y = 0.5800x$; $r^2 = 0.9941$) and the total polyphenol content was expressed as milligram of Gallic Acid Equivalent per gram of extract (mg GAE/g). The determination was performed in triplicate.

HPLC-DAD procedure. 10 mg of extracts were dissolved in 1 mL of MeOH and centrifuged at 13000 rpm for 10 min prior to injection (10 µL). HPLC analyses were run on a 2695 Waters[®] separation module equipped with a diode array detector 2996 Waters[®]. Separations were carried out on a Lichrospher[®] column 100 RP-18 (125x4 mm i.d., 5 µm) protected with a Lichrocart[®] 4-4 guard cartridge (4x4 mm i.d.), using a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and methanol (solvent B) and the separation was performed by the following linear gradient: 25-100% B (0-40 min), 100% B (40-45 min). UV detection was achieved at three wavelengths: 254, 280 and 350 nm.

Analytical TLC. Analytical TLC was performed on TLC Alugram Xtra SIL G/UV₂₅₄, using a mixture of cyclohexane:AcOEt 85:15 as eluant. Spots in the chromatogram were visualized by spraying with vanillin-sulfuric acid reagent (2 mL of concentrated sulfuric acid in 98 mL of a 1:99 w/v vanillin: 95% ethanol solution) and heating the chromatograms at 110°C for five minutes.

Fractionation by Flash Chromatography. 18 g of propolis powder were macerated in ethanol (6 x 200 mL, 2 h) to give, after solvent evaporation, 4.2 g of crude extract **E1b**. **E1b** was totally dissolved in the minimum volume of DCM and the solution was mixed with 8.4 g of silica gel. The solvent was allowed to evaporate until a fine dry powder was obtained. The fractionation was performed by using a CombiFlash Teledyne ISCO apparatus with a silica gel column (Rediseq silica 80g), with a gradient elution of 100% cyclohexane to 100% EtOAc, and a flow rate of 35 mL/min. 200 tubes of 20 mL were collected and combined into 10 fractions on the basis of their TLC chromatographic profiles (cyclohexane: EtOAc 85:15).

¹H and ¹³C NMR analyses. NMR spectra were recorded in CDCl₃ using a Bruker Avance spectrometer at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C.

GC-MS procedure. The GC-MS analysis was performed on non-derivatized samples using an Agilent Technologies Gas Chromatograph 6890N connected to an Agilent Technologies 5975B mass detector system with an ionization voltage of 70eV. Separations were carried out using a 30 m long, 0.32 mm id, 0.5 mm film ultra 1 100% dimethylpolyxiloxane column. The temperature was programmed as follows: 180°C (3 min), 180-280°C at the rate of 10°C/min and 280°C (30 min). Helium was used as a carrier gas at a flow rate 1.5 mL/min. Injector and detector temperatures were set at 250 and 280°C, respectively. Metabolites were identified by comparing their retention times and/or their fragmentation patterns with those of authentic samples and/or those contained in the fragmentation pattern library of the equipment (NIST Library in Chem Station G1701DA).

Evaluation of antioxidant activity using the DPPH assay. The assay was carried following a modified procedure on a reported methodology (Abdel-Lateff *et al.* 2002). Sample and standards were diluted in absolute ethanol at 0.02 mg/mL from stock solutions prepared at 1 mg/mL in DMSO; 100 µL aliquots of these solutions were placed in 96-well plates and the reaction was initiated by adding 25 µL of freshly prepared DPPH solution (1mM) and 75 µL of absolute ethanol using the microplate reader's injector (Infinite[®] 200, Tecan, France) to obtain a final volume of 200 µL per well. After 30 minutes in the dark and at room temperature, the absorbance was determined at 517 nm. Ethanol was used as a blank, whereas 10, 25, 50, and 75 µM solutions of Trolox (hydrophilic α-tocopherol analog) were used as calibration solutions. A sample of 0.02 mg/mL chlorogenic acid was used as a quality control. The evaluation was carried out in triplicate. The DPPH-scavenging activity was compared with that of Trolox using the calibration curve. Result was expressed in terms of Trolox equivalents (micromoles of Trolox equivalents per gram of extract).

Evaluation of the antifungal activity. Antifungal activity was assayed on human pathogenic fungi, including a yeast (*Candida albicans* ATCC 66396) and an opportunistic mould (*Aspergillus fumigatus* CBS 11326). The strains were obtained from the parasitology and mycology laboratory, University Hospital Center, Angers, France. Both microorganisms were cultivated at 37 °C on yeast extract–peptone–dextrose agar (YPDA) containing 0.5 g/L chloramphenicol for two (*C. albicans*) or three (*A. fumigatus*) days. Tests were performed according to a procedure described by Alomar *et al.* (Alomar *et al.* 2012) following the guidelines of the approved reference method of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) for yeasts (NCCLS, 1997) and filamentous fungi (NCCLS, 2002). Briefly, the yeast suspensions were prepared in RPMI-1640 culture medium and adjusted spectrophotometrically at 630 nm to reach a final concentration of *ca.* 0.5×10^3 to 2.5×10^3 cells/mL. The tests were performed using sterile 96 flat shaped well microtiter plates. Serial two-fold sample dilutions were made in DMSO. Sample solutions (E1a and fractions A, B and C) were dispensed at a volume of 5 µL in triplicate into the wells to obtain final concentrations from 250 to 1.95 µg/mL. After 48 h at 37°C for *C. albicans*, and 72 h for *A. fumigatus*, the spectrophotometric MIC endpoint was calculated from the turbidimetric data as the lowest sample concentration causing a growth inhibition equal to or greater than 80% of the control (MIC₈₀). Amphotericin B was used as a positive control.

Evaluation of antibacterial activity. Antibacterial activity was evaluated on 21 bacterial strains obtained from the laboratory of bacteriology, University Hospital Center, Angers, France: seven strains of *Acinetobacter baumannii* (RCH, SAN008, 12, AYE, CIP7034, CIP107292, CIP5377), five of *Staphylococcus aureus* (ATCC25923, two methicillin-sensitive clinical isolates, two methicillin-resistant clinical isolates), two of *Escherichia coli* (ATCC25922 and a clinical isolate), three of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853 and two clinical isolates), and one clinical isolate each of *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, and *Salmonella enteritidis* (phage type 4). Tests were performed using the methodology described in the guidelines of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, www.sfm.asso.fr). Briefly, a stock solution of each sample was prepared at 20 mg/mL in DMSO under sterile conditions. Serial dilutions were prepared (sample concentrations: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100 µg/mL) and 100 µL of each dilution were added to 19.9 mL Mueller Hinton agar (Merck Germany) and transferred to Petri plates. Bacterial strains (2×10^4) were suspended in sterile NaCl aqueous solution (0.15M) and inoculated on the different Petri plates using the multipoint inoculator (AQS, England). After 24h of incubation at 37°C, the minimum inhibitory concentration (MIC₁₀₀ µg/mL) of each sample against each bacterial strain was determined.

RESULTS

The propolis EtOH extract (**E1a**) did not show a significant polyphenol content (18.2 ± 2.9 mg GAE/g); this unexpected finding was confirmed by the lack of phenolic components in the HPLC profile of **E1a** and by its lack of antioxidant activity when tested in the DPPH radical reduction assay.

The sequential gradient extraction of the propolis sample using cyclohexane (**E2**), DCM (**E3**), EtOAc (**E4**), and MeOH (**E5**) showed that the majority of the components were extracted into the most abundant (> 60%) low-polarity cyclohexane fraction (**E2**, Table 1), which exhibited a TLC profile very similar to that of **E1a**. None of the remaining fractions was obtained in more than 5% yield and none showed the presence of significantly important components by TLC. These results implied that the studied propolis was predominantly composed of non polar components in addition to beeswax. Since beeswax could be removed by cold filtration in EtOH, **E1a** was chosen to carry out the chemical characterization of the propolis.

Flash chromatography purification of **E1b** yielded three major fractions (**A**, **B** and **C**; Fig. 1), which accounted for more than 70% of the total crude extract (Table 2). ¹H NMR analyses of **E1a** and fractions **A**, **B** and **C** showed predominantly signals in the range of 0.8-3.0 ppm, with a few between 4.0-5.5 ppm, while the majority of the signals in the corresponding ¹³C NMR spectra were located between 15 and 60 ppm, in addition to a few in the range of 110-150 ppm, that matches to triterpenes profiles. The GC/MS analysis of the most abundant fraction **A**, which showed a major low-polarity component by TLC ($R_f = 0.70$), allowed its identification as a mixture of α and β -amyrenone (**I** and **II**, respectively; structures of metabolites **I-VIII** are shown in Fig. 2), containing a small amount of α -amyrin acetate (**III**). The TLC analysis of fraction **B** showed the presence of a single component ($R_f = 0.33$) that proved to be inseparable under TLC conditions using a number of solvent systems; GC/MS analysis of **B** allowed the identification of the main component as a mixture of α -amyrin (**IV**, major) and β -amyrin (**V**, minor). Finally, the GC/MS analysis of the least-abundant fraction **C**, which showed a major high-polarity component in its TLC profile ($R_f = 0.18$), allowed its identification as a mixture of sterols, with fucosterol (**VI**) being the major component, and a mixture of β/γ -sitosterol (**VII/VIII**) being the minor one.

Evaluation of the antimicrobial activities of **E1b** and fractions **A**, **B** and **C** showed that they did not exhibit neither antifungal nor antibacterial activities when tested towards two fungal species ($MIC_{80} > 250 \mu\text{g/mL}$) and 21 bacterial strains ($MIC_{100} > 100 \mu\text{g/mL}$), respectively.

DISCUSSION

The results obtained in this investigation were unexpected since, to date, there are only a limited number of reports about triterpenoids occurring as major components in propolis (de Castro Ishida *et al.* 2011; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Melliou *et al.*, 2007; Furukawa *et al.* 2002; Ito *et al.* 2001; Velikova *et al.*, 2000) and none of the propolis types that have been chemically described until now list triterpenes as their major components (Salatino *et al.* 2011; Sforcin and Bankova, 2011). Additionally, our results are not in agreement with reports stating that triterpenoids are rarely reported as propolis constituents because most chemical analyses of propolis samples are carried out with alcoholic extracts (Negri *et al.* 2003), or that triterpenoids are only occasionally collected by bees along with other classes of secondary metabolites such as phenolics (Negri *et al.* 2000).

The two plants used by the bees for their production of propolis in the region of Quintana Roo where the material was collected are commonly known with the Mayan names of “chakah” [*Bursera simaruba* (L.) Sarg.] and “tsalam” [*Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth.] (Luis Ignacio Hernández-Chávez, personal communication), and both species are found as part of the flora of what is known as a mature medium-statured semideciduous forest (*selva mediana*)

(Schultz, 2009). While no phytochemical knowledge exists about *L. latisiliquum*, the bark and resin of *B. simaruba* have been reported to contain lignans and other phenolic metabolites (Maldini et al., 2009; Peraza-Sánchez and Peña-Rodríguez, 1992), with the resin also reported to contain pentacyclic triterpenes such as the ubiquitous α -amyrin (**IV**) and β -amyrin (**V**) (Peraza-Sánchez *et al.* 1995). Although no lignans could be detected in the analyzed samples, these findings could confirm the reported relationship that exists between the flora available to bees in a given region and the chemical composition of the propolis that they produce (Adelmann *et al.* 2007; Bankova, 2005a; de Castro Ishida *et al.* 2011; Dausch *et al.* 2008; Salatino *et al.* 2011; Sforcin and Bankova, 2011) and the fact that in tropical regions, the chemical composition of the propolis can be highly variable because of the richness and versatility of the local flora (Trusheva *et al.* 2004).

Finally, it is well known that propolis is mainly used by bees as a defense material against parasites (Salatino *et al.* 2011) and to prevent bacterial and fungal infections and that often, while the biological activity of different propolis samples is similar, the secondary metabolites responsible for the activity can be different (Bankova, 2005b; Trusheva *et al.* 2006). Although **E1a** did not show significant antioxidant or antimicrobial activity, pentacyclic triterpenoids which include α -amyrin (**IV**) and β -amyrin (**V**) and their various derivatives have been reported as antibacterials, antifungals and with cytotoxic activity (Choi *et al.* 2012; Chung *et al.* 2013; Cota *et al.* 2011; Irshad *et al.* 2013; Sharma *et al.* 2010); the lack of activity of both the propolis extract **E1a** and the purified fractions **A-C** in the assays for antioxidant and antimicrobial activity, suggests that the chemical composition of the propolis collected in Quintana Roo is of particular importance in the ecological interaction between the bees and the parasites and microorganisms that occur specifically in that region. Therefore additional research works will be needed to establish the mode of protective action of this Mexican propolis.

ABBREVIATIONS USED

ATCC American Type Culture Collection; **CBS** Central Bureau voor Schimmelcultures; **CDCl₃** Deuterated chloroform; **DCM** Dichloromethane; **DMSO** Dimethylsulfoxide; **DPPH** Diphenylpicrylhydrazyl; **EtOAc** Ethyl Acetate; **GC/MS** Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry; **HPLC/DAD** High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detector; **MIC** Minimum Inhibitory Concentration; **NCCLS** National Committee for Clinical Laboratory Standards; **NMR** Nuclear Magnetic Resonance; **RPMI** Roswell Park Memorial Institute; **TLC** Thin Layer Chromatography; **UV** Ultraviolet; **YPDA** Yeast Peptone Dextrose Agar.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Marie Kempf and Viviane Cassisa of the GEIHP (EA 3142/SFR 4208, University of Angers) for the microbiological assays. This work was supported by a research fellowship granted to LMPR by the “Region des Pays de Loire” (France).

SUPPORTING INFORMATION

HPLC profile of EtOH extract (E1a) and GC-MS data of E1b and fractions A-C are available in Supporting Information.

REFERENCES

- ABDEL-LATEFF, A; KÖNIG, G M; FISCH, K M; HÖLLER, U; JONES, P G; WRIGHT, A D (2002) New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products*, 65(11): 1605–1611. <http://dx.doi.org/10.1021/np020128p>
- ADELMANN, J; PASSOS, M; BREYER, D H; DOS SANTOS, M H R; LENZ, C; LEITE N F; LANÇAS, F M; FONTANA, J D (2007) Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(1): 174–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.014>
- ALOMAR, K; GAUMET, V; ALLAIN, M; BOUET, G; LANDREAU A (2012) Synthesis, crystal structure, characterisation, and antifungal activity of 3-thiophene aldehyde semicarbazone (3STCH), 2,3-thiophene dicarboxaldehyde bis(semicarbazone) (2,3BSTCH2) and their nickel (II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 115: 36–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.04.022>
- BANKOVA, V (2005a) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2): 114–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>
- BANKOVA, V (2005b) Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1): 29–32. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh059>
- BANKOVA, V; DE CASTRO, S L; MARCUCCI, M C (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3–15. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000102>
- CASTALDO, S; CAPASSO, F (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 (suppl 1): S1–S6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00185-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00185-5)
- CASTRO ISHIDA (DE), V F; NEGRI, G; SALATINO, A; BANDEIRA, M F C L (2011) A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125(3): 966–972. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.089>
- CHOI, J W; CHO, E J; LEE, D G; CHOI, K; KU, J; PARK, K-W; LEE, S (2012) Antibacterial Activity of Triterpenoids from *Clerodendron trichotomum*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 55(3): 169–172. <http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2012.026>
- CHUNG, P Y; CHUNG, L Y; NAVARATNAM, P (2013) Transcriptional profiles of the response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to pentacyclic triterpenoids. *PLoS One* 8(2): e56687. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056687>
- COTA, B B; JOHANN, S; OLIVEIRA, D M; SIQUEIRA, E P; SOUZA-FAGUNDES, E M; CISALPINO, P S; ALVES T M A; ZANI, C L (2011) Biological potential of *Stillingia oppositifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1): 70–77. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000016>
- COTTICA, S M; SAWAYA, A C H F; EBERLIN, M N; FRANCO, S L.; ZEOULA, L M; VISENTAINER, J V (2011) Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different

methods of extraction. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 22(5): 929–935. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000500016>

DAUGSCH, A; MORAES, C S; FORT, P; PARK, Y K (2008) Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4): 435–441. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem057>

FURUKAWA, S; TAKAGI, N; IKEDA, T; ONO, M; NAFADY, A M; NOHARA, T; SUGIMOTO, H; DOI, S; YAMADA, H (2002) Two novel long-chain alkanolic acid esters of lupeol from alecrim-propolis. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 50(3): 439–440. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911218>

GÜLÇİN, İ; BURSAL, E; ŞEHİTOĞLU, M H; BİLSEL, M; GÖREN, A C (2010) Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9): 2227–2238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053>

IRSHAD, M; AHMAD, A; ZAFARYAB, M; AHMAD, F; MANZOOR, N; SINGH, M; RIZVI, M M A (2013) Composition of Cassia fistula oil and its antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis. *Natural product communications*, 8(2): 261–264. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23513744>

ITO, J; CHANG, F-R; WANG, H-K; PARK Y K; IKEGAKI, M; KILGORE, N; LEE K-H (2001) Anti-AIDS Agents. 48.1 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *Journal of Natural Products*, 64(10): 1278–1281. <http://dx.doi.org/10.1021/np010211x>

KALOGEROPOULOS, N; KONTELES, S J; TROULLIDOU E; MOURTZINOS, I; KARATHANOS, V T (2009) Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116(2): 452–461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.060>

KUJUMGIEV, A; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y; BANKOVA, V; CHRISTOV, R; POPOV, S (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3): 235–240. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7)

KUMAZAWA, S; HAMASAKA, T; NAKAYAMA, T (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3): 329–339. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)

LI, F; AWALE, S; TEZUKA, Y; ESUMI, H; KADOTA, S (2010) Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of Natural Products*, 73(4): 623–627. <http://dx.doi.org/10.1021/np900772m>

LONDONO OROZCO, A; AVILA ACEVEDO, J G; CANALES MARTINEZ, M M; HERNANDEZ DELGADO, C T; SERRANO, P R; FLORES ORTIZ, C M; DIAZ, A D; PENIERES CARRILLO, J G; GARCIA TOVAR, C G; CRUZ SANCHEZ, T A (2010) Antibacterial Comparative Study Between Extracts of Mexican Propolis and of Three Plants Which Use *Apis mellifera* for its Production.

Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(8): 1250–1254.
<http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2010.1250.1254>

LOTTI, C; CAMPO FERNANDEZ, M; PICCINELLI, A L; CUESTA-RUBIO, O; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I; RASTRELLI, L (2010) Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4): 2209–2213. <http://dx.doi.org/10.1021/jf100070w>

MARCUCCI, M C (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2): 83–99. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19950202>

MALDINI, M; MONTORO P; PIACENTE, S; PIZZA C (2009) Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70: 641–649. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.02.009>

MELIOU, E; STRATIS, E; CHINOI, I (2007) Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103(2): 375–380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.033>

MIGUEL, M G; NUNES, S; DANDLEN, S A; CAVACO, A M; ANTUNES, M D (2010) Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 3418–3423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.014>

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (1997), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved standard M27-A, Villanova, PA. .

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2002), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved standard, NCCLS Document M38-A., Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA. .

NEGRI, G; MARCUCCI, MC; SALATINO, A; SALATINO, M L F (2000) Comb and propolis waxes from Brazil: Triterpenoids in propolis waxes - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research*, 39(1-2): 86–88. http://www.ibra.org.uk/articles/20091216_12

NEGRI, G; SALATINO, M L F; SALATINO, A (2003) Unusual chemical composition of a sample of Brazilian propolis, as assessed by analysis of a chloroform extract - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research*, 42(4): 53–56. http://www.ibra.org.uk/articles/20080613_23

OTA, C; UNTERKIRCHER, C; FANTINATO, V; SHIMIZU, M T (2001) Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44(9-10): 375–378. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00671.x>

PARK, Y K; ALENCAR, S M; AGUIAR, C L (2002) Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(9): 2502–2506. <http://dx.doi.org/10.1021/jf011432b>

PERAZA-SÁNCHEZ, S R; PEÑA-RODRÍGUEZ, L M (1992) Isolation of Picropolygamain from the Resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, 55(12): 1768–1771. <http://dx.doi.org/10.1021/np50090a009>

- PERAZA-SÁNCHEZ, S R; SALAZAR-AGUILAR, N E; PEÑA-RODRÍGUEZ, L M (1995) A New Triterpene from the Resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, 58(2): 271–274. <http://dx.doi.org/10.1021/np50116a019>
- PINO, J A; MARBOT, R; DELGADO, A; ZUMÁRRAGA, C; SAURI, E (2006) Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. *Journal of Essential Oil Research*, 18(1): 53–56. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699384>
- POPOVA, M; SILICI, S; KAFTANOGLU, O; BANKOVA, V (2005) Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3): 221–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007>
- RAGHUKUMAR, R; VALI, L; WATSON, D; FEARNLEY, J; SEIDEL, V (2010) Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of ‘pacific propolis’ and isolated prenylflavanones. *Phytotherapy Research*, 24(8): 1181–1187. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3096>
- REBIAI, A; LANEZ, T; BELFAR, M L (2011) In vitro evaluation of antioxidant capacity of Algerian propolis by spectrophotometrical and electrochemical assays. *International Journal of Pharmacology*, 7(1): 113–118. <http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2011.113.118>
- SALATINO, A; FERNANDES-SILVA, C C; RIGHI, A A; SALATINO, M L F (2011) Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28(5): 925–936. <http://dx.doi.org/10.1039/C0NP00072H>
- SALATINO, A; TEIXEIRA, E W; NEGRI, G; MESSAGE, D (2005) Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1): 33–38. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh060>
- SAWAYA, A C H F; PALMA, A M; CAETANO, F M; MARCUCCI, M C; DA SILVA CUNHA, I B; ARAUJO, C E P; SHIMIZU, M T (2002) Comparative study of in vitro methods used to analyze the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, 35(3): 203–207. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01169.x>
- SCHULTZ, G P (2009) Vascular flora of the El Edén Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 132(Apr 2005): 311–322. [http://dx.doi.org/10.3159/1095-5674\(2005\)132\[311:VFOTEE\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.3159/1095-5674(2005)132[311:VFOTEE]2.0.CO;2)
- SFORCIN, J M; BANKOVA, V (2011) Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2): 253–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>
- SHARMA, S; SINGH, T; VIJAYVERGIA, R (2010) Antimicrobial properties of β -Amyrin (Terpenoid). *JPR: BioMedRx: An International Journal*, 3(8): 1979–1980. <http://jpronline.info/index.php/jpr/article/view/3383>
- TOLOSA, L; CANIZARES, E (2002) The collection, characterisation and evaluation of antimicrobial of propolis extracts from Campeche, Mexico. *Ars Pharmaceutica*, 43(1-2): 187–204. <http://farmacia.ugr.es/ars/articuloen.php?233>
- TRUSHEVA, B; POPOVA, M; BANKOVA, V; SIMOVA, S; MARCUCCI, M C; MIORIN, P L; DA ROCHA PASIN, F; TSVETKOVA, I (2006) Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis.

Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 3(2): 249–254.
<http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nel006>

TRUSHEVA, B; POPOVA, M; NAYDENSKI, H; TSVETKOVA, I; GREGORIO RODRIGUEZ, J; BANKOVA, V (2004) New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*, 75(7–8): 683–689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2004.08.001>

VELAZQUEZ, C; NAVARRO, M; ACOSTA, A; ANGULO, A; DOMINGUEZ, Z; ROBLES, R; ROBLES-ZEPEDA, R; LUGO, E; GOYCOOLEA, F M; VELAZQUEZ, E F; ASTIAZARAN, H; HERNANDEZ, J (2007) Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1747–1756. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x>

VELIKOVA, M; BANKOVA, V; MARCUCCI, M C; TSVETKOVA, I; KUJUMGIEV, A (2000) Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55c: 785-789.

ILLUSTRATIONS AND GRAPHICS

Figure 1. TLC profiles of E1b and fractions A, B and C.

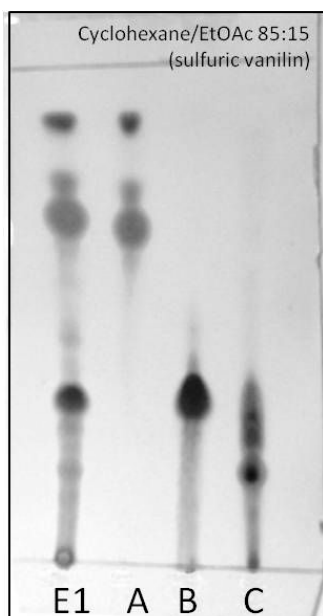
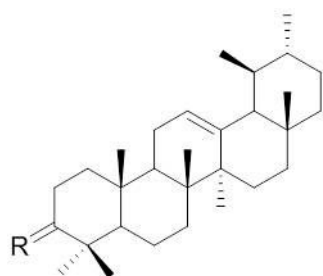
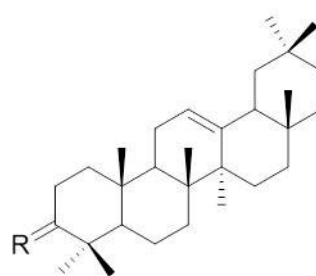


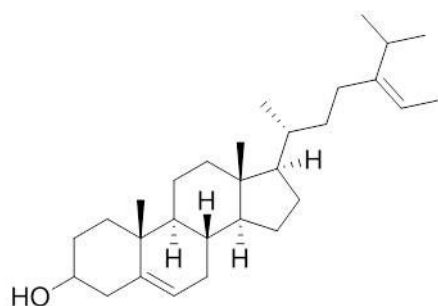
Figure 2. Structures of major constituents identified in E1b and fractions A, B and C by GC-MS analyses



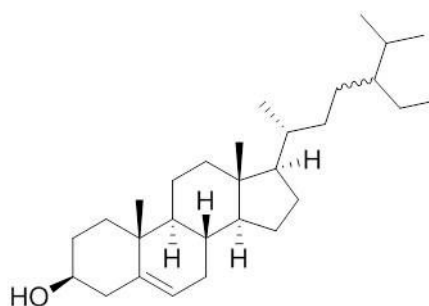
R: O, α -amyrenone **I** (A)
 R: α =H, β =OAc, α -amyrin acetate **III** (A)
 R: α =H, β =OH, α -amyrin **IV** (B)



R: O, β -amyrenone **II** (A)
 R: α =H, β =OH, β -amyrin **V** (B)



Fucosterol **VI** (C)



β/γ -sitosterol **VII/VIII** (C)

TABLES

Table 1. Yields of propolis extracts

Extract	Solvent	Extraction yield (%)
E1a	EtOH	34.2
E2	Cyclohexane	61.6
E3	DCM	2.5
E4	EtOAc	1
E5	MeOH	4.6

Table 2. Yields of fractions **A**, **B** and **C** and R_f values of their major components on TLC

Fraction	Yield (%)	R_f^*
A	47.7	0.89, 0.77, 0.70
B	19.9	0.33
C	4.1	0.18
Total	71.7	

*Eluant system: cyclohexane:EtOAc 85:15

Unusual chemical composition of a Mexican propolis collected in Quintana Roo, Mexico

Séverine Boisard,^a Thi Huong Tho Huynh,^a Fabiola Escalante-Erosa,^b Luis Ignacio Hernández-Chavez,^c Luis Manuel Peña-Rodríguez,^b and Pascal Richomme^a

^aEA 921 SONAS/SFR 4207 QUASAV, Université d'Angers, 16 Bd Daviers, 49045 Angers Cedex 01, France

^bUnidad de Biotecnologia, Centro de Investigación Cientifica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

^cInstituto Superior de Felipe Carrillo Puerto, Carrillo Puerto Quintana Roo, México

SUPPORTING INFORMATION

List of supporting information:

Fig. S1. HPLC chromatographic profile of extract **E1a** at 254 (a), 280 (b) and 350 nm (c).

Fig. S2a. GC chromatographic profile of fraction **A**

Fig. S2b. MS spectra of components in fraction **A**

Fig. S3a. GC chromatographic profile of fraction **B**

Fig. S3b. MS spectra of components in fraction **B**

Fig. S4a. GC chromatographic profile of fraction **C**

Fig. S4b. MS spectra of components in fraction **C**

Fig. S5a. GC chromatographic profile of extract **E1b**

Fig. S5b. MS spectra of components in extract **E1b**

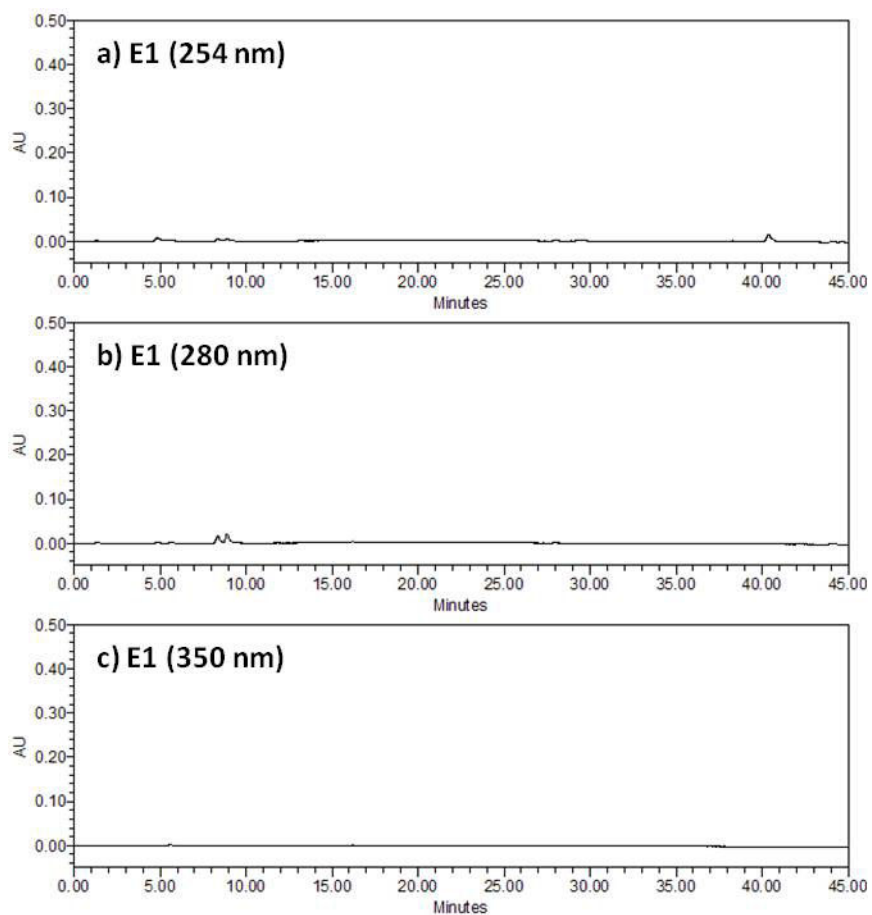


Fig. S1. HPLC chromatographic profile of EtOH extract (**E1a**) at 254 (a), 280 (b) and 350 nm (c).

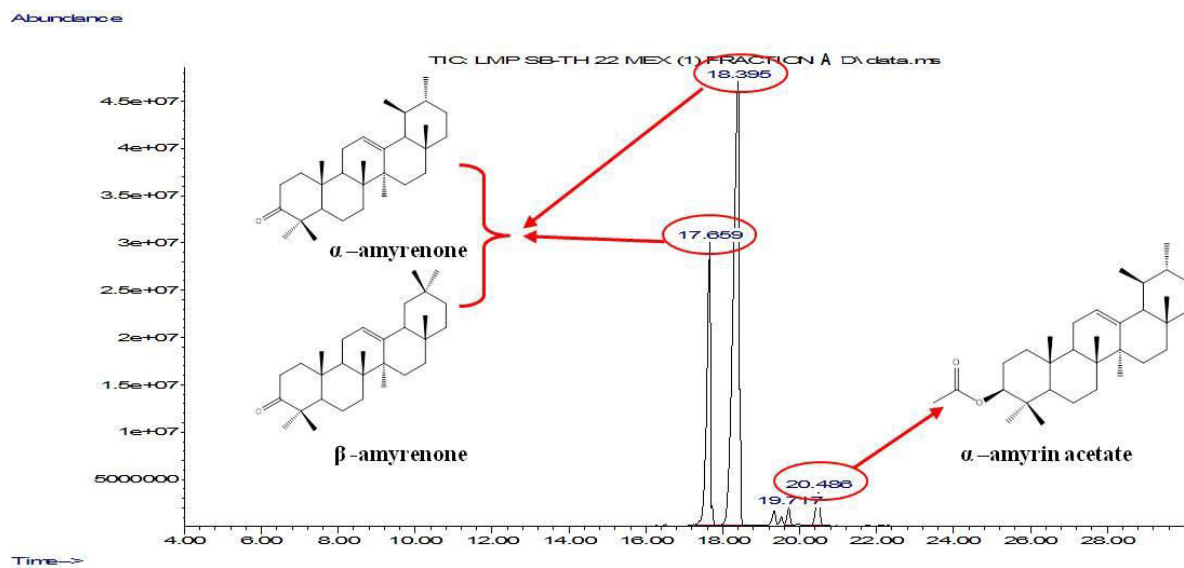


Fig. S2a. GC chromatographic profile of fraction A

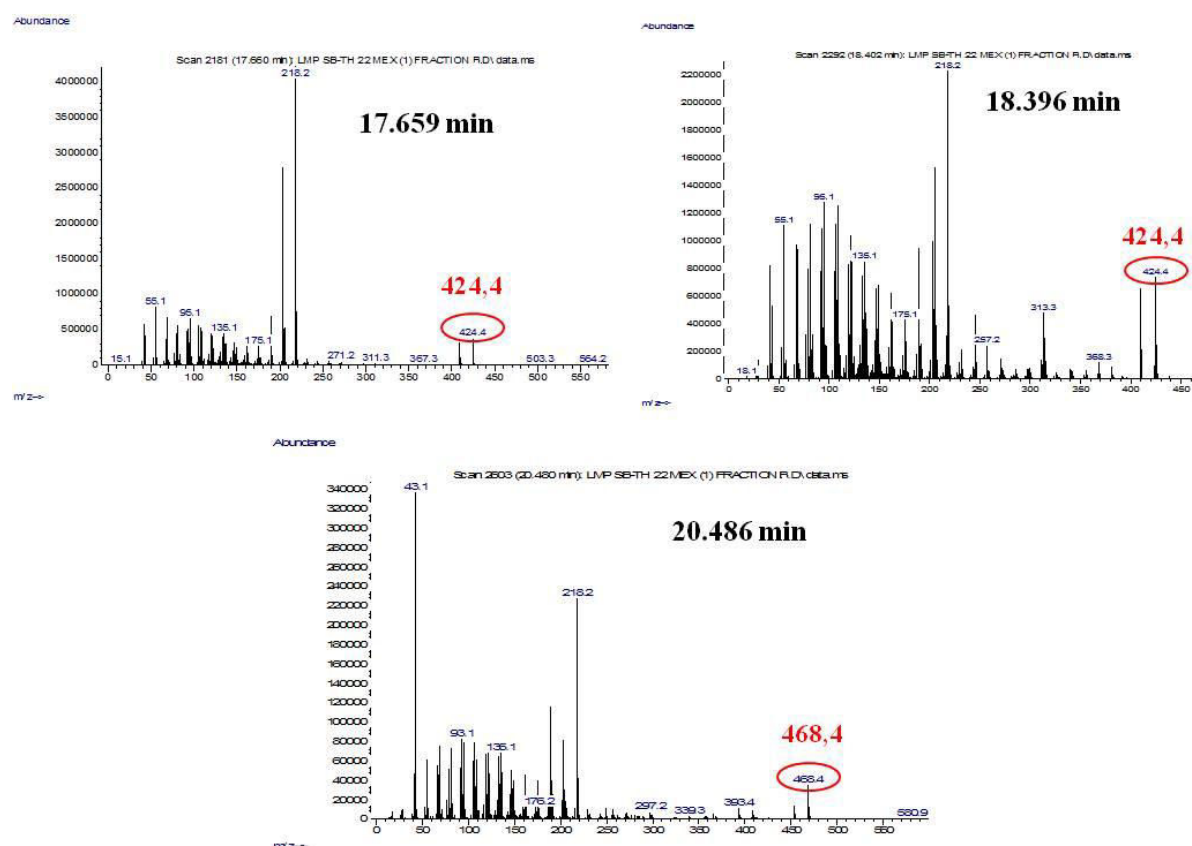


Fig. S2b. MS spectra of components in fraction A

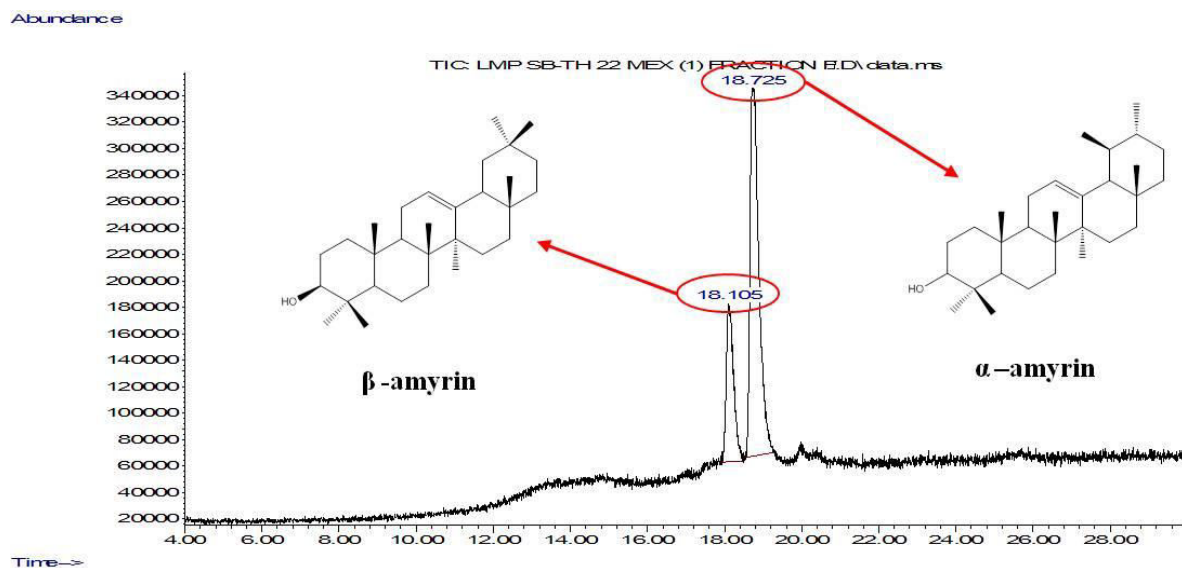


Fig. S3a. GC chromatographic profile of fraction B

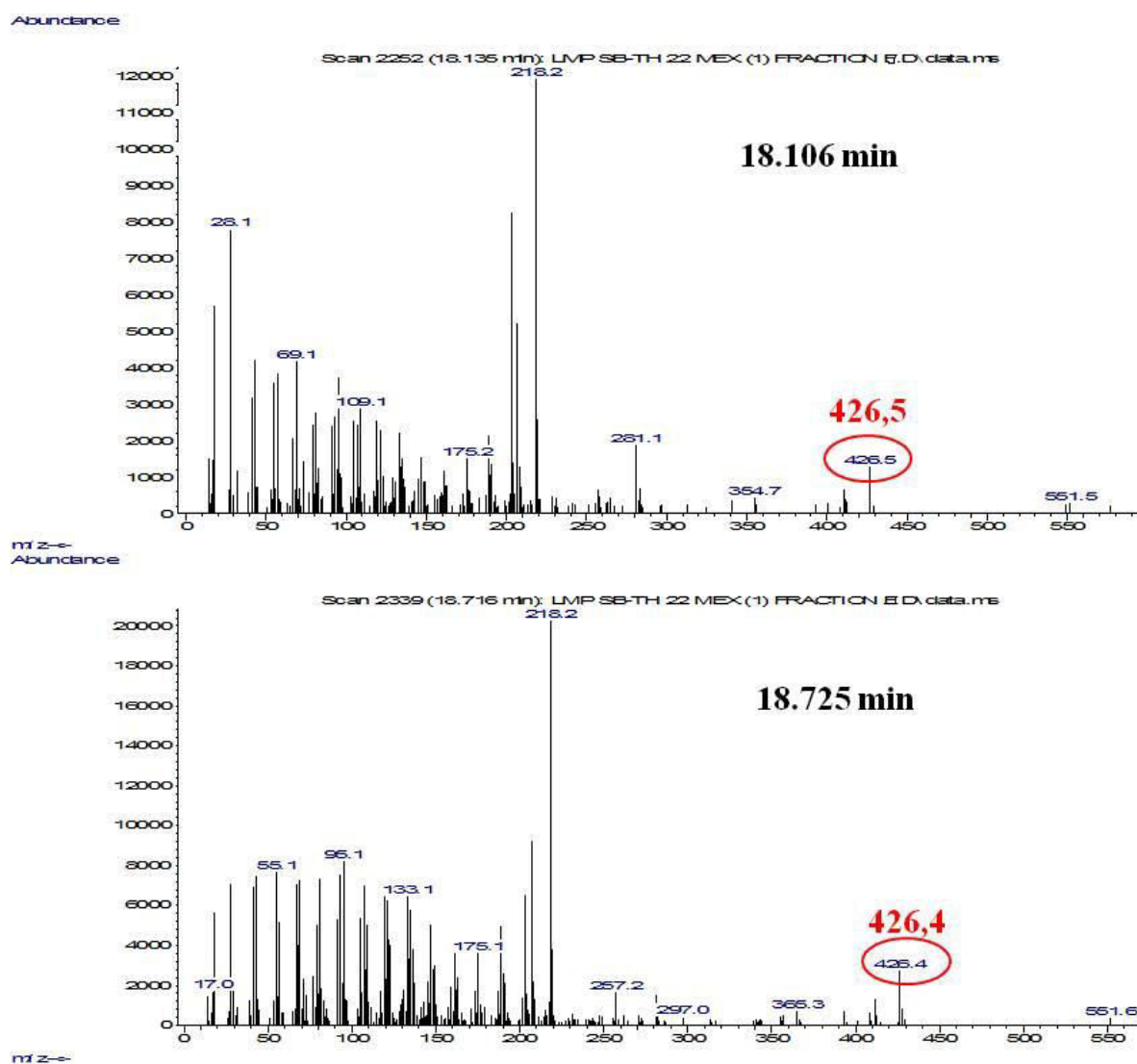


Fig. S3b. MS spectra of components in fraction B

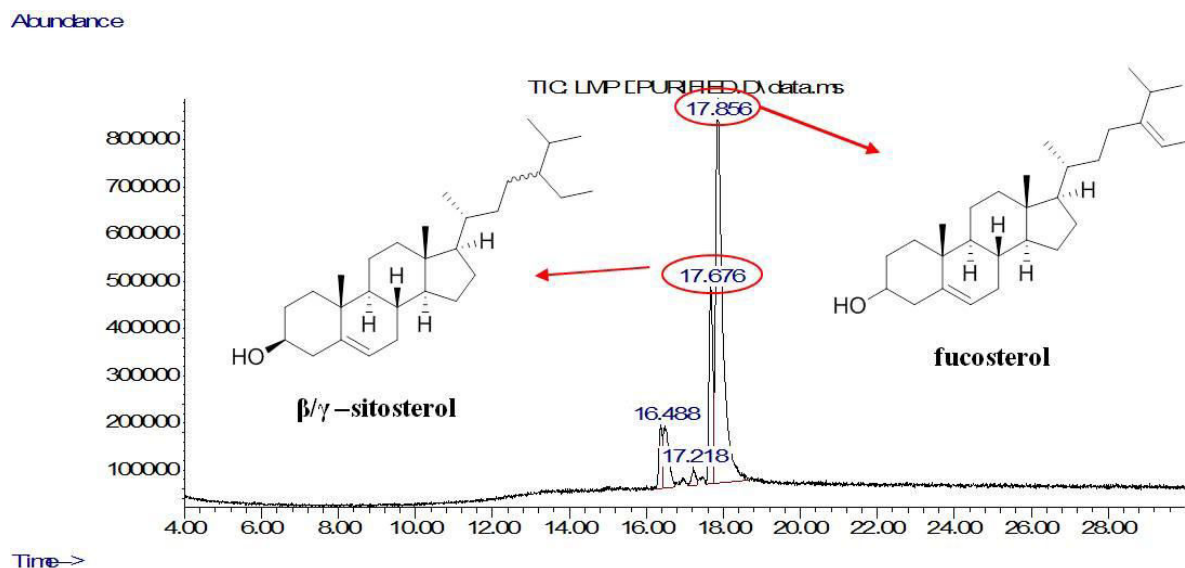


Fig. S4a. GC chromatographic profile of fraction C

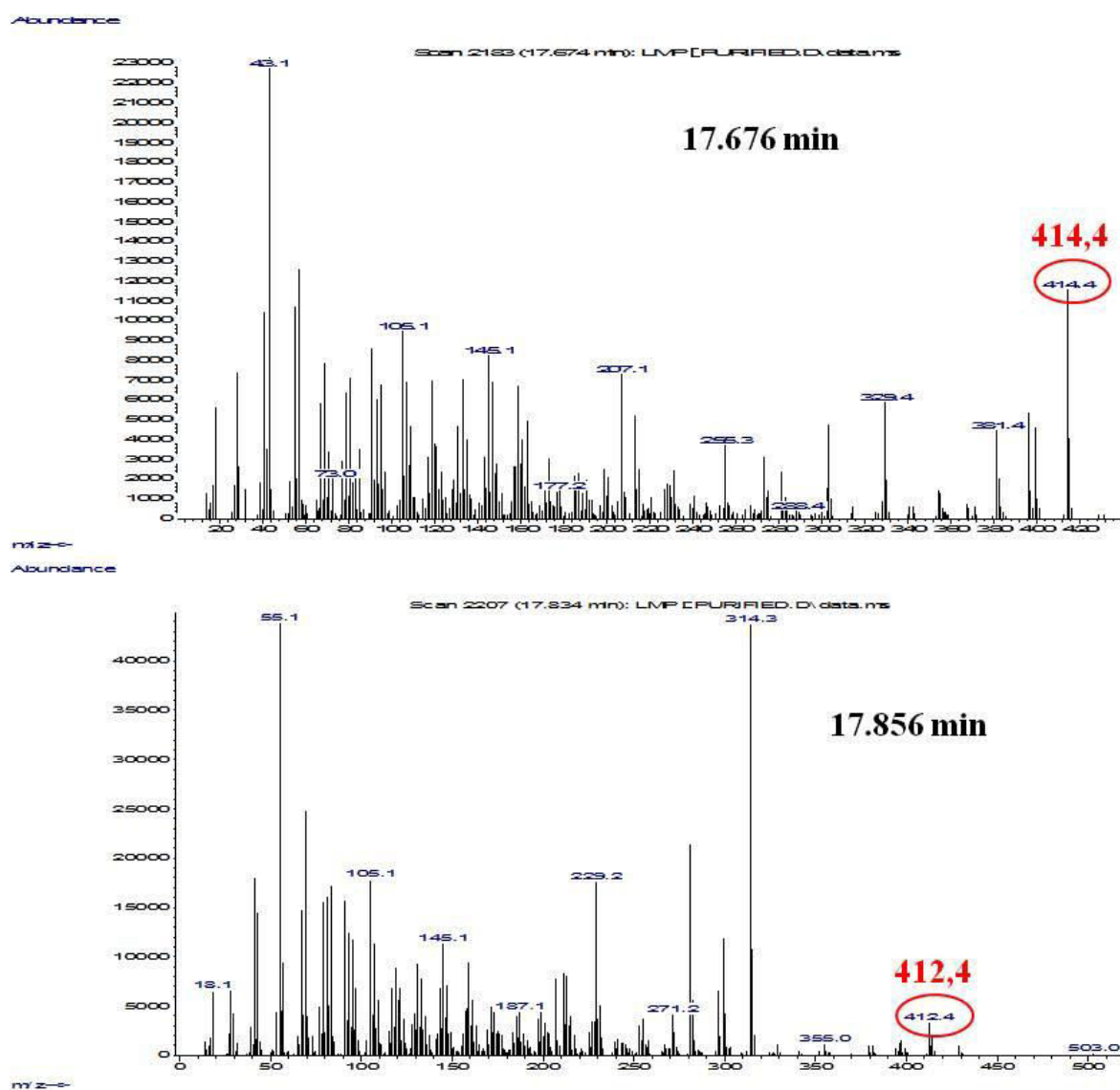


Fig. S4b. MS spectra of components in fraction C

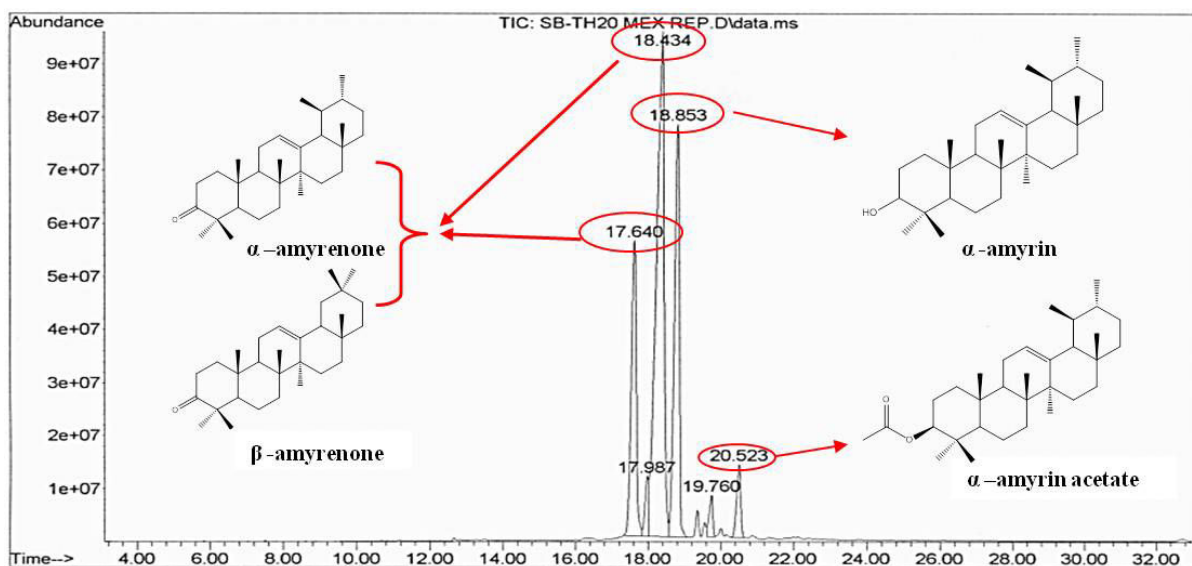


Fig. S5a. GC chromatographic profile of extract **E1b**

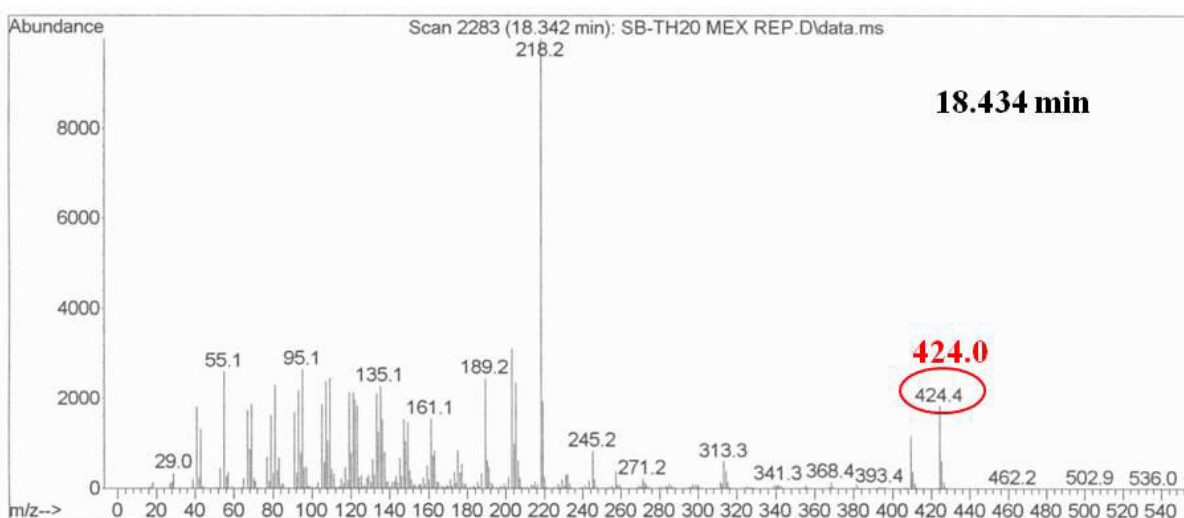
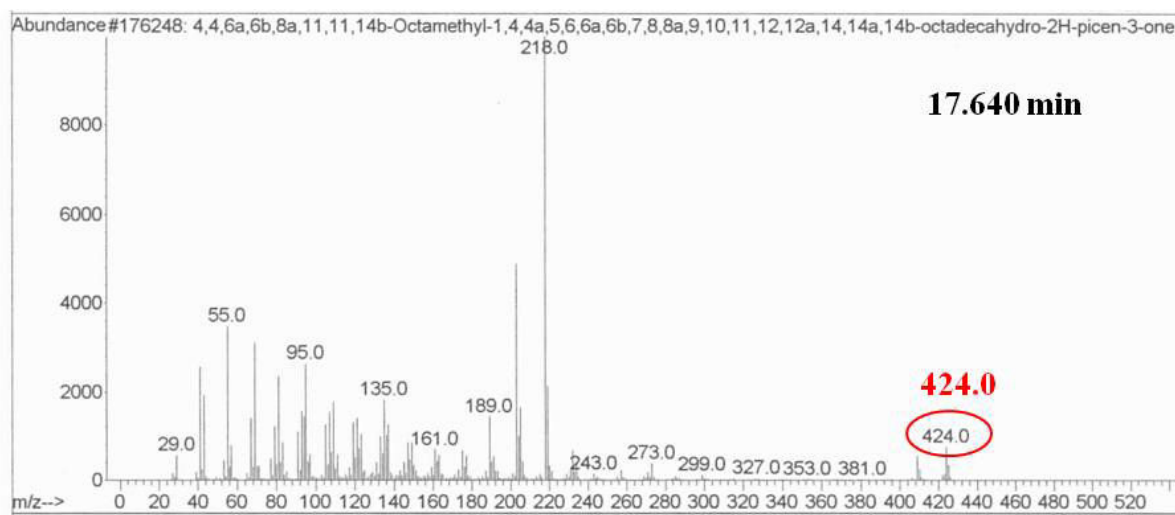


Fig. S5b-i). MS spectra of components in extract **E1a** (first part)

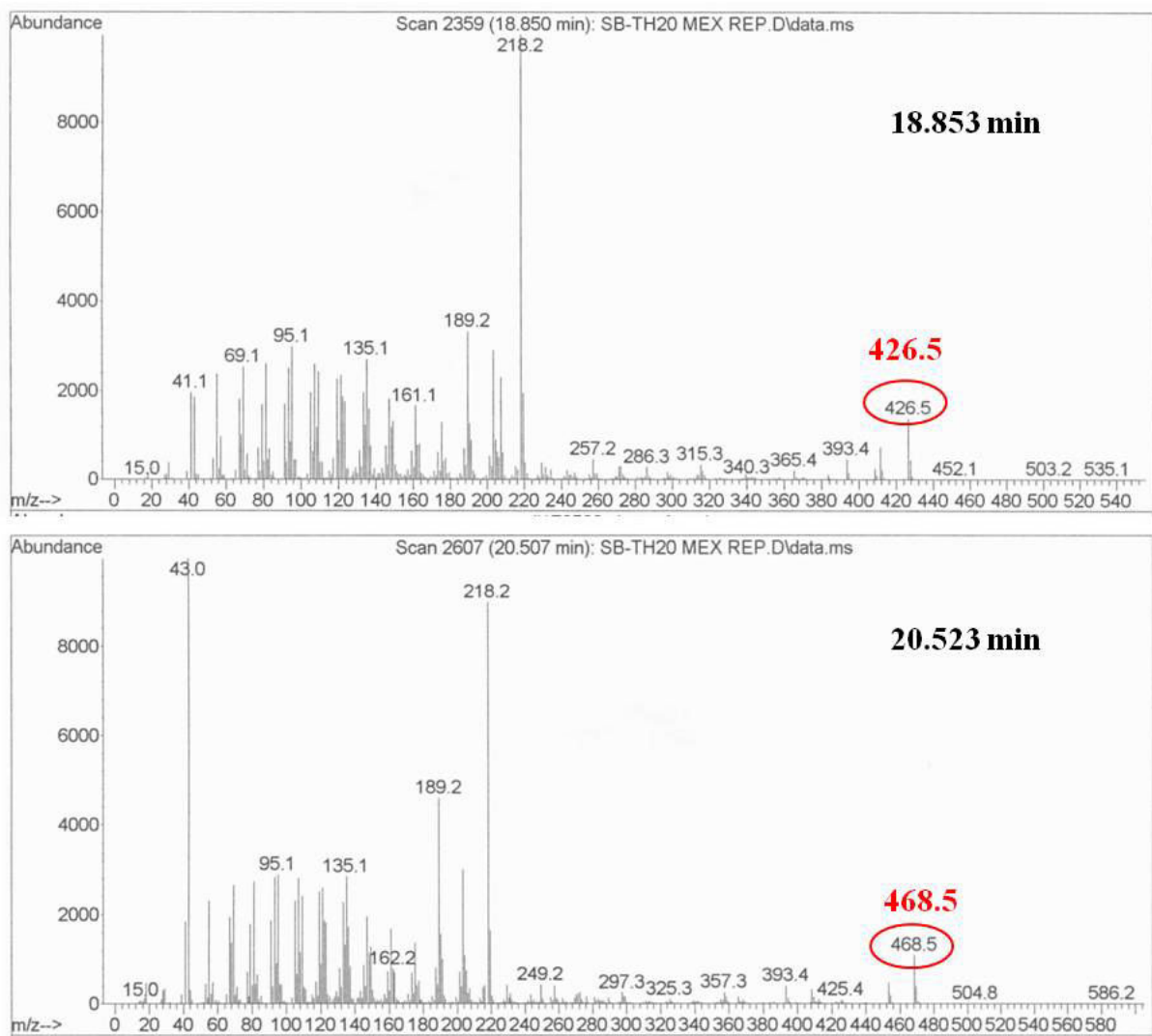


Fig. S5b-ii). MS spectra of components in extract **E1a** (second part)

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Séverine BOI SARD**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **09 / 10 / 2014**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

Thèse de Doctorat

Séverine BOISARD

Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis

Chemical characterization and biological valorisation of propolis extracts

Résumé

La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles sur certaines parties des végétaux. Sa composition en métabolites secondaires est alors variable puisqu'elle dépend notamment de la flore locale près du site de collecte. Dans cette étude, la caractérisation chimique d'un échantillon représentatif de la propolis française de l'entreprise "Ballot-Flurin Apiculteurs" a conduit, au moyen d'analyses HPLC/DAD/MS et RMN 1D & 2D, à l'identification de 51 composés dont deux sont originaux. Les acides et esters phénoliques ainsi que les flavonoïdes identifiés dans cette propolis indiquent qu'elle appartient au type "peuplier". L'évaluation des activités biologiques de différents extraits et composés isolés a montré que cette propolis, qui possède une bonne activité antioxydante (DPPH et ORAC) associée à un potentiel antiglycant (anti-AGEs) très intéressant, représente un bon candidat pour la prévention des maladies, telles que le diabète, impliquant les AGEs. Elle montre également de bonnes activités antifongiques, sur deux levures du genre *Candida*, et antibactériennes sur *Staphylococcus aureus* et ses souches résistantes et sensibles à la méticilline, ces dernières étant responsables, à l'heure actuelle, de nombreuses infections nosocomiales. Une étude de variabilité interlots ainsi qu'un travail d'optimisation du procédé d'extraction industriel par plan d'expériences ont également été réalisés (partie confidentielle). Enfin, l'analyse de trois autres propolis, provenant d'Amérique Latine (Mexique) et d'Afrique (Côte d'Ivoire et Ouganda), a montré de grandes diversités de résultats en termes de compositions chimiques et d'activités biologiques.

Mots clés

Propolis type "peuplier", composés phénoliques, flavonoïdes, antioxydant, anti-AGEs, *Staphylococcus aureus*, propolis mexicaine, propolis africaine

Abstract

Propolis is a resinous substance collected by honeybees from various plant sources. Its secondary metabolites composition depends on the local flora around the collection site. During this study, the chemical characterization of a representative sample of a French propolis produced by "Ballot-Flurin Apiculteurs" led, through structural identifications involving HPLC/DAD/MS as well as 1D & 2D NMR, to the identification of 51 compounds, two of them being new. Phenolic acids and esters and flavonoids identified in this propolis indicate that it belongs to the so-called "poplar" type. The evaluation of the biological activities of different extracts or isolated compounds showed that this propolis, which exhibits a significant antioxidant activity (DPPH and ORAC) associated with a very interesting anti-glycation (anti-AGEs) potential, would represent a good candidate for the prevention of diseases involving AGEs such as diabetes. These extracts or compounds also exhibit antifungal and antibacterial activities towards two *Candida* yeasts on the one hand, and *Staphylococcus aureus* and its methicillin-resistant and susceptible strains on the other hand, the latter being nowadays responsible for many nosocomial infections. A study dealing with the interbatch variability accompanied by an optimization of the industrial extraction process using experimental design were also carried out (Confidential part). Finally, the analysis of three propolis originating from Latin America (Mexico) and Africa (Ivory Coast and Uganda), revealed a great diversity of results in relation to chemical compositions and biological activities.

Key Words

"Poplar" type propolis, phenolic derivatives, flavonoids, antioxidant, anti-AGEs, *Staphylococcus aureus*, Mexican propolis, African propolis