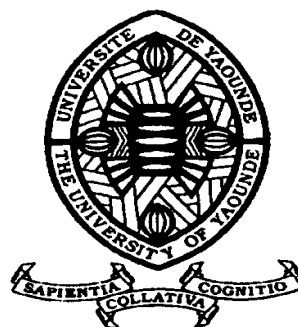


REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT
LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE
ET TOXICOLOGIE

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE,
HEALTH
AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES
LABORATORY OF
PHARMACOLOGY AND
TOXICOLOGY

**Etude bioguidée des effets de *Harungana
madagascariensis* Lam. et *Psorospermum aurantiacum*
Engl. sur quelques aspects biochimiques du
vieillessement cutané**

THESE

« Présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat/Ph.D. en Biochimie

Par : **MANJIA NJIKAM Jacqueline**
Master en Biochimie

Sous la direction de
MOUNDIPA FEWOU Paul
Professeur, Université de Yaoundé 1
NJAYOU Frederic Nico
Maître de Conférences, Université de Yaoundé 1

Année Académique : 2019 - 2020



REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix—Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

B.P. 812 Yaoundé

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace—Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

P.O. Box 812 Yaounde

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

Yaoundé, le... **24 JUN 2020** ...

ATTESTATION DE CORRECTION DE THESE DE DOCTORAT/PhD.

Nous soussignés, membres du jury de Soutenance de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie intitulée « *Etude bioguidée des effets de *Harungana madagascariensis* Lam. et *Psorospermum aurantiacum* Engl. sur quelques aspects biochimiques du vieillissement cutané* » de Madame MANJIA NJIKAM Jacqueline, Matricule 06R495, autorisée par la correspondance N° 20 - 742/UUI/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD/CB-nsr de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé 1 en date du 01 Juin 2020,

Attestons qu'après la soutenance publique de sa Thèse de Doctorat/Ph.D en date du 15 Juin 2020 à l'Université de Yaoundé 1, elle a effectué toutes les corrections conformément aux remarques et suggestions des membres du Jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Membres du Jury

Président du Jury

Nancy Florentine
Maître de Conférences

Fabrice J. Boyem, Sc.
Professor of Biochemistry

Le Chef de Département de Biochimie



**LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I
ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

Chef de Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

Chef de Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BCH) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste

14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargé de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/Uyi</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>
14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	DZEUFUET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	<i>En Poste</i>
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	<i>En Poste</i>
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	<i>En poste</i>

23	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	BELLETT EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
28	DONFACK Mireille	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
37	NGOuateu KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargé de Cours	<i>Chef Div. UBA</i>
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
43	YEDE	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	<i>En poste</i>
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	<i>En poste</i>
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	<i>En poste</i>
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	<i>En poste</i>
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	<i>En poste</i>

3- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargé de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
22	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
26	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
27	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste

28	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
32	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ. Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ. Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée de Mission PR</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste

18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOLOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service Programme & Diplomes</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Directeur MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargé de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargé de Cours	En poste
31	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
13	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
14	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D ENSET. Ebolowa
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
22	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
23	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
24	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
25	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
26	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DEPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargé de Cours	En poste

26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargé de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistante	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE (PHY) (42)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
6	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
7	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
8	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
9	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
10	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
11	WOAFO Paul	Professeur	En poste
12	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
13	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargé de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
40	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
41	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
42	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI

13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargé de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épse NOUMBEM	Chargé de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste

43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste
----	--------------------	-----------	----------

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DEPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (05)	3 (2)	39 (16)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (13)
BPV	06 (0)	10 (02)	9 (04)	07 (01)	31 (9)
CI	10 (1)	09 (02)	13 (02)	02 (0)	35 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	03 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	10 (02)	26 (3)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (01)	30 (2)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	17 (5)
PHY	11 (0)	16 (01)	10 (03)	03 (0)	40 (4)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (04)	02 (0)	43(6)
Total	68 (4)	99 (27)	132 (29)	45 (10)	344 (70)

Soit un total de **344 (70)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (27)**
- Chargés de Cours **132 (29)**
- Assistants **46 (10)**

() = Nombre de Femmes **45**

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A DIEU TOUT-PUISSANT ;

A la famille NJIKAM, particulièrement à mon feu père Njikam

Hénock ;

A mon époux et à mes enfants.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené jusqu'à son terme grâce à la disponibilité, la collaboration et le soutien sans faille de plusieurs personnes et institutions. Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma gratitude :

- ☞ **Au Pr. Moundipa Fewou Paul**, co-directeur de thèse et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université de Yaoundé I. Vous m'avez fait profiter de votre savoir et de vos conseils afin d'améliorer ce travail. Vos encouragements et votre disponibilité m'ont amené à repousser mes limites pour parvenir à finaliser cette thèse.
- ☞ **Au Pr. NJAYOU Frédéric Nico**, co-directeur de thèse. En acceptant de diriger ce travail avec toute la rigueur scientifique qui vous ait reconnue, vous avez inculqué en moi le sens du surpassement de soi et de la recherche continue de l'excellence. Pour votre étudiante que j'ai été, vous demeurez un modèle à suivre sur le double plan humain et professionnel.
- ☞ **Au Dr. R. V Devkar**, de la Division de Phytothérapie et d'Endocrinologie Métabolique, du Département de zoologie, Faculté des sciences, Université Maharaja Sayajirao de Baroda, Inde, qui m'a accueilli dans son Laboratoire pour la réalisation d'une partie de ce travail ainsi qu'à son équipe de recherche pour son assistance sur la paillasse.
- ☞ **Au Dr. Lyndy J. McGaw**, du Laboratoire de Phytomédecine, Département des Sciences paracliniques, Faculté des sciences vétérinaires, de l'Université de Pretoria, Afrique du Sud, pour la réalisation des tests anti- inflammatoires.
- ☞ **Au Pr. MKOUNGA Pierre** du Laboratoire de Substances Naturelles et de Synthèses Organiques de l'Université de Yaoundé 1, pour le soutien matériel et l'expertise que vous m'avez apportés pour la réalisation du fractionnement des extraits et l'isolement des composés.
- ☞ **Au Dr. Tchana Angèle** pour ses multiples conseils.
- ☞ **A tous les Enseignants** du Département de Biochimie pour la formation académique reçue.
- ☞ **A Tous mes aînés de laboratoire** pour leur assistance et pour tous les conseils qu'ils m'ont prodigués pendant la réalisation de ce travail.

- ☞ **A M. Harishchander Anandaram** du Département de bioinformatique, Université Sathyabama, Chennai, Inde, pour l'analyse bioinformatique.
- ☞ **A Mes camarades de promotion, mes cadets de laboratoire et amis**, pour leur soutien moral et leur aide sur la paillasse.
- ☞ **A ma belle mère**, pour sa disponibilité et ses encouragements.
- ☞ **A la famille Ndam**, pour son encouragement.
- ☞ **A mes neveux et nièces**, que ce travail soit pour eux un vecteur d'émulation.
- ☞ **A tous ceux** qui n'ont pas été cités nommément et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils soient rassurés de ma profonde gratitude.
- ☞ **A la bourse CV Raman for African researcher** du Gouvernement Indien, j'exprime toute ma reconnaissance pour avoir financé une partie de mes travaux de recherche.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES	i
DEDICACES	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
TABLE DES MATIERES	xix
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	xxvi
LISTE DES TABLEAUX	xxviii
LISTE DES FIGURES	xxix
RESUME	xxxiii
ABSTRACT	xxxiv
INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. Introduction.....	1
2. Hypothèse de recherche	3
3. Objectifs	4
3.1. Objectif général	4
3.2 Objectifs spécifiques.....	4
CHAPITRE I: REVUE DE LITTERATURE.....	5
I. Généralités sur l'anatomie, l'histologie et le fonctionnement de la peau.....	5
I.1- Anatomie et Histologie.....	5
I.1.1- L'épiderme.....	6
I.1.1.1- Les Kératinocytes.....	6
I.1.1.2- Les Mélanocytes.....	6
I.1.1.3- Les cellules de Langerhans	8
I.1.1.4- Les cellules de Merkel.....	8
I.1.2- Le derme	8
I.1.2.1- Les cellules du derme	10
a-) Les fibroblastes	10

b-) Les macrophages et les cellules dendritiques	14
c-) Les mastocytes	15
I.1.3- L'hypoderme.....	15
I.1.4- Annexes cutanées	15
I.1.4.1- Les glandes sudoripares.....	16
I.1.4.2- Les follicules pilo-sébacés et les ongles	16
I.2- Fonctions de la peau.....	16
II. Le vieillissement cutané.....	17
II.1- Vieillissement intrinsèque.....	18
II.1.1-La perte des télomères.....	19
II.1.2- Variations hormonales	20
II.1.3- Le stress oxydant et radicaux libres.....	21
II.1.4- Facteurs enzymatiques	22
II.1.5- Théorie de la glycation non enzymatique	23
II.2- Vieillissement cutané extrinsèque	23
II.2.1- Le rayonnement solaire	24
II.2.1.1- Mécanismes du photo-vieillissement	25
a-) Mécanismes au niveau des fibroblastes.....	25
b-) Mécanismes au niveau des mélanocytes	28
c-) Mécanismes au niveau des cellules Inflammatoires et immunosuppression locales	29
II.2.2- Autres facteurs.....	31
II.2.3- Mécanisme général d'induction du vieillissement cutané extrinsèque.....	32
III. Vieillissement intrinsèque/extrinsèque.....	33
IV- Système de protection et méthodes de prévention du vieillissement cutané.....	38
IV.1- Système de protection	38
IV.1.1- La protection contre le soleil.....	38
IV.1.1.1- La barrière cornée.....	38

IV.1.1.2- La protection mélanique	38
IV.1.1.3- la protection par le film hydrolipidique de surface	39
IV.1.2- La protection contre les radicaux libres.....	39
IV.1.2.1- Système antioxydant.....	39
IV.1.2.2- Le piégeage des ions métalliques	40
IV.1.2.3- <i>Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2</i> (Nrf2)	41
IV.2- Méthode de prévention du vieillissement cutané.....	42
IV.2.1- Méthode basée sur l'utilisation des produits cosmétiques.....	42
IV.2.2- Méthode basée sur l'utilisation des plantes médicinales	42
V- Méthodes d'induction du vieillissement cutané au laboratoire et d'évaluation des propriétés antiviellissement cutané des plantes médicinales/produits cosmétiques	42
V.1- Méthode <i>ex-vivo</i> et <i>in vivo</i>	42
V.2- Méthode <i>in vitro</i>	46
V.2.1- Tests d'inhibition des enzymes	46
V.2.2- Tests antioxydants	47
V.2.3- Tests anti- inflammatoires.....	48
V.2.4- Test anti- mélanogénèse.....	49
V.2.5- Evaluation de la biosynthèse du collagène	49
V.3- Méthode <i>in silico</i> par <i>docking moléculaire</i>	49
VI- Travaux antérieures sur les plantes étudiées.....	52
VI.1- <i>Harungana madagascariensis</i>	52
VI.2- <i>Psorospermum aurantiacum</i>	53
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	55
II.1- Matériel	55
II.1.1- Matériel végétal	55
II.1.2- Lignées cellulaires.	55
II.1.2.1- Les cellules NIH/3T3	55

II.1.2.2- Les cellules B16F10.....	55
II.1.2.3- Les cellules RAW 264.7.....	55
II.1.3- Réactifs et appareils	56
II.1.3.1- Réactifs.....	56
II.1.3.2- Appareils	57
II.2- Méthodes.....	57
II.2.1- Préparation de l'extrait brut et des fractions des plantes	57
II.2.2- Recherche <i>in vitro</i> des fractions de <i>H. madagascariensis</i> ou de <i>P. aurantiacum</i> possédant à la fois un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase.....	59
II.2.2.1- Evaluation des propriétés anti oxydantes des fractions de plantes	59
II.2.2.2- Mesure de l'inhibition de l'activité de la tyrosinase et de l'élastase par les fractions de plantes	61
II.2.2.3- Evaluation des propriétés anti-inflammatoires des fractions de plantes.....	64
II.2.3- Effet des fractions actives sur les dommages induits par les rayons UVB sur les cellules (NIH/3T3 et B16F10) de la peau de souris	68
II.2.3.1- Evaluation de la production intracellulaire des espèces oxygénées réactives induites par les rayons UVB	71
II.2.3.2- Elimination des fractions actives mimant l'action des rayons UVB	72
II.2.3.3- Analyse de l'expression des gènes cibles par <i>Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)</i>	73
II.2.3.4- Effet des fractions actives sur la production de la mélanine par les cellules B16F10 après irradiation par les rayons UVB	76
II.2.4- Détermination du profil phytochimique et effet anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase de quelques composés isolés des fractions actives.....	77
II.2.4.1- Analyse du profil chimique des composés des fractions actives.....	77
a-) Mise en évidence des composés chimiques présents dans les fractions actives de plantes	77
b-) Analyse des composés présents dans les fractions actives par Chromatographie en phase Liquide à Haute Pression couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	79

c-) Isolement bio guidé des composés.....	80
II.2.4.2- Détermination des propriétés anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase de quelques composés isolés des fractions actives	82
II.2.4.2.1- Effets des composés sur l'activité de l'élastase et de la 15-lipoxygénase.....	82
a-) Approche par amarrage moléculaire (<i>docking moléculaire</i>)	82
b-) Approche par évaluation des activités au moyens des tests biochimiques	83
II.2.5- Analyses statistiques	83
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	84
III. Résultats.....	84
III.1- Rendement de fractionnement des extraits bruts de plantes	84
III.2- Détermination des fractions actives de <i>H. madagascariensis</i> et <i>P. aurantiacum</i> possédant les activités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-elastase et anti-tyrosinase.....	85
III.2.1- Activité antioxydante des différentes fractions de plantes	85
III.2.2- Activités anti-inflammatoires.....	88
III.2.3- Inhibition de l'activité des enzymes élastase et tyrosinase par les fractions de plantes	92
III.2.4- Conclusion partielle 1	95
III.3- Activité de protection des cellules (NIH/3T3 et B16F10) de peau de souris par les fractions actives de plantes et dommages induits par les rayons UVB	96
III.3.1- Dommages induits par les rayons UVB dans les cellules (NIH/3T3 et B16F10) de peau de souris.....	96
III.3.1.1- Conditions expérimentales à l'altération morphologique et la modification des gènes de metalloproteinase matricielle-1(MMP-1) et de procollagène de type 1(COL1A1) après irradiation des fibroblastes (NIH/3T3) par les rayons UVB.....	96
III.3.1.2- Conditions expérimentales à la modification des gènes tyrosinase(TYR) et <i>tyrosinase related proteine-1</i> (TRP-1) dans les cellules B16F10 après irradiation des mélanomes (B16F10) par les rayons UVB.....	97
III.3.1.3- Génération du stress oxydatif.....	101

III.3.2- Effet des fractions actives sur les fibroblastes et les mélanomes de peau de souris irradiées par les rayons UVB	102
III.3.2.1- Effet des fractions actives sur la viabilité cellulaire et sur l'expression des gènes d'intérêt.....	102
III.3.2.1.1- Effet des fractions actives sur la viabilité cellulaire	102
III.3.2.1.2- Repression du gène COL1A1 dans les cellules NIH/3T3 et des gènes TYR et TRP-1 dans les cellules B16F10 par les fractions actives de plantes	104
III.3.2.2- Effet du prétraitement par les fractions actives de plantes des fibroblastes et des mélanomes de peau des souris irradiés par les rayons UVB	107
III.3.2.2.1- Protection de la morphologie cellulaire des fibroblastes NIH/3T3	107
III.3.2.2.2- Taux d'expression du gène de la métalloprotéinase matricielle-1 (MMP-1) et du gène de procollagène de type I (COL1A1) dans les fibroblastes NIH/3T3.....	109
III.3.2.2.3- Taux d'expression des gènes de TYR et TRP-1 dans les mélanomes B16F10....	109
III.3.2.2.4- Inhibition du stress oxydatif dans les cellules B16F10 et NIH/3T3.....	112
III.3.2.2.5- Taux d'expression de l'ARNm du facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf-2) et de l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans des cellules NIH/3T3 et B16F10.....	114
III.3.2.2.6- Réduction par les fractions de plantes de la teneur en mélanine induites par UVB dans les cellules B16F10.....	117
III.3.3- Conclusion partielle 2.....	119
III.4- Profil phytochimique et effets anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase de quelques composés isolés des fractions actives	120
III.4.1- Profil chimique des fractions actives.....	120
III.4.2- Effets anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase des composés isolés de la fraction PAH	126
III.4.2.1- Effet anti-élastase des composés isolés de PAH	126
III.4.2.1.1- Interactions entre le site actif de l'élastase et les composés isolés.....	126
a-) Interaction avec la 3-géranyloxyémodinanthrone (M).....	126
b-) Interaction avec la 3-géranyloxyémodin (S).....	126
c-) Interaction avec le lupéole (E).....	127

III.4.2.1.2- Interactions entre le facteur de transcription AP-1 et les composés isolés	128
a-) Interaction avec la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M).....	128
b-) Interaction avec la 3-géranxyloxyémodin (S)	128
c-) Interaction avec le lupéole (E)	129
III.4.2.1.3- Inhibition de l'activité de l'élastase <i>in vitro</i>	129
III.4.2.2- Inhibition de la 15-lipoxygénase par les composés isolés de PAH.....	132
III.4.2.2.1- Interactions entre le site actif de la 15-lipoxygénase et les composés isolés	132
a-) Interaction avec la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M).....	132
b-) Interaction avec la 3-géranxyloxyémodin (S).....	132
c-) Interaction avec le lupéole (E)	133
III.4.2.2.2- Interactions entre le facteur de transcription NFκB et les composés isolés	134
a-) Interaction avec 3-géranxyloxyémodinanthrone (M).....	134
b-) Interaction avec 3-géranxyloxyémodin (S)	134
c-) Interaction avec le lupéole (E)	135
III.4.2.2.3- Inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase <i>in vitro</i>	136
III.4.2.3- Inhibition de la tyrosinase par les composés isolés de PAH.....	139
III.4.2.4- Inhibition de la production du NO.....	140
III.4.3- Conclusion partielle 3	142
III.5- Discussion	143
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	154
1. Conclusion générale	154
2. Perspectives.....	156
BIBLIOGRAPHIE	157
WEBOGRAPHIE.....	175
ANNEXES	a
PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE	A

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ANOVA: *Analysis of variance* (Analyse de la variance)

AP-1: *Activator protein-1*

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

CCM: Chromatographie sur couche mince

CE₅₀: Concentration efficace 50

CH₂CL₂/MeOH: Chlorure de méthylène/ méthanol

CI₅₀: Concentration inhibitrice 50

COL1A1: Collagène de type 1

CP₅₀: Concentration de piégeage 50

DMEM: Dulbeco's Eagle Modified Medium

DMSO: Diméthyl sulfoxyde.

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EOR: Espèces oxygénées réactives

H₂DCFDA: 2'-7'-Dichloro-dihydrofluorescein diacetate

HM: *Harungana madagascariensis*

HO-1: *Heme oxygenase-1*

HPLC: Chromatographie liquide de haute pression

Keap-1: *Kelch-like ECH-associated protein-1*

LOX: *15-lipoxygenase*

LPS: Lipopolysacharides

MMP-1: Matrice mettalloproteinase-1

MTT: *3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-Diphényltetrazolium bromide*

NFκB: *Nuclear Factor kappa B*

NIH: *National Institute of Health*

NO: *Nitric Oxide*

Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

PA: *Psorospermum aurantiacum*

PBS: *Phosphate Buffer Salin*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

TRP-1: *Tyrosinase related protein-1*

TRP-2: *Tyrosinase related protein-2*

TYR: *Tyrosinase*

UV-B: *Ultraviolet B*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Effets généraux du vieillissement intrinsèque et photo- vieillissement sur les composantes cutanées.....	34
Tableau II: Quelques gènes régulés dans les fibroblastes et les mélanocytes âgés.....	37
Tableau III: Quelques plantes aux propriétés antiviellissement et leurs mécanismes d'action.	43
Tableau IV: Séquences des amorces utilisées pour la PCR Semi-quantitative.....	76
Tableau V: Rendements de fractionnement des extraits bruts de plantes.	84
Tableau VI: Pouvoir réducteur des fractions de plantes.....	85
Tableau VII: Valeurs de CE ₅₀ , CP ₅₀ et PA des fractions de plantes pour le piégeage du DPPH.	87
Tableau VIII: Viabilité cellulaire et inhibition de la production du NO par les macrophages activés (RAW264.7) en présence des fractions de plantes	90
Tableau IX: Valeurs des CI ₅₀ de quelques fractions de plantes pour l'inhibition de la lipoxigénase b.....	91
Tableau X: Valeurs des CI ₅₀ des fractions de plantes pour l'inhibition de l'élastase.....	93
Tableau XI: Quelques classes de composés chimiques présentes dans les fractions actives HMH et PAM de plantes	120
Tableau XII: Temps de retention, noms et structures des composés	124
Tableau XIII: Activité anti-élastase des composés	131
Tableau XIV: Activité anti-lipoxigénase des composés.....	138
Tableau XV: Valeurs des IC ₅₀ des composés pour l'inhibition de la tyrosinase	140
Tableau XVI: Inhibition du nitric oxide produit par les macrophages activés (RAW264.7) par les composés ainsi que leur viabilité cellulaire	141

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma de la peau	5
Figure 2: Biosynthèse de la mélanine.....	7
Figure 3: Fibroblaste (A) et fibrocyte (B).....	10
Figure 4: Synthèse du collagène de type I.....	12
Figure 5: Représentation schématique du processus d'auto-amplification impliqué dans le vieillissement cutané	18
Figure 6: Mécanismes du vieillissement cutané intrinsèque.....	19
Figure 7: La perte des télomères lors du vieillissement cutané intrinsèque.	20
Figure 8: Représentation schématique des mécanismes par lesquels les EOR et les stress oxydatifs contribuent au processus du vieillissement	22
Figure 9: Pénétration des radiations solaires dans la peau.	25
Figure 10: Production des espèces réactives de l'oxygène par l'action des rayons UV et les lésions cellulaires induites au niveau des fibroblastes	27
Figure 11: Effets des UV sur les fibroblastes	28
Figure 12: Mécanismes d'induction de la mélanogénèse par les rayons ultra-violets	29
Figure 13: Les principales voies métaboliques de l'acide arachidonique	31
Figure 14: Voies d'induction du vieillissement cutané prématuré.....	33
Figure 15: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	40
Figure 16: Mode d'action de l'hème oxygénase	41
Figure 17: Les étapes du <i>docking moléculaire</i>	50
Figure 18: Structure cristallographique des enzymes	50
Figure 19: Photographie de <i>Harungana madagascariensis</i>	53
Figure 20: Photographie de <i>Psorospermum aurantiacum</i>	54

Figure 21: Diagramme de fractionnement des extraits bruts.....	58
Figure 22: Zone linéaire illustrant l'activité de l'élastase.....	62
Figure 23: Chambre de Neubauer.....	70
Figure 24: Protocole d'extraction et d'isolement des composés.....	81
Figure 25: Piégeage du DPPH par les fractions de plantes à différentes concentrations.	86
Figure 26: Viabilité des cellules RAW 264.7 en présence des fractions de plantes à la concentration de 100 µg/mL.....	88
Figure 27: Production du NO par les RAW 264.7 en présence des fractions de plantes à la concentration de 100µg/mL.....	89
Figure 28: Inhibition par les fractions de plantes à différentes concentrations de la production du NO par cellules RAW 264.7	89
Figure 29: Inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase par les fractions de plantes à différentes concentrations.....	91
Figure 30: Inhibition de l'activité de l'élastase par les fractions de plantes à la concentration de 100µg/mL.....	92
Figure 31: Inhibition de l'activité de l'élastase par la fraction hexanique de PA à différentes concentrations	93
Figure 32: Inhibition de l'activité de la tyrosinase par les fractions de plantes à la concentration de 100µg/mL.....	94
Figure 33: Modification de la morphologie des cellules NIH/3T3 irradiées par les rayons UVB.....	98
Figure 34: Modification de l'expression des ARNm des gènes de metalloproteinase matricielle-1(MMP-1) et de procollagène de type 1(COL1A1) dans les cellules NIH/3T3 irradiées par les rayons UVB	99
Figure 35: Induction des dommages par les rayons UVB dans les cellules B16F10.....	100
Figure 36: Fluorescence des cellules NIH/3T3 et B16F10 après irradiation par les rayons UVB.....	101

Figure 37: Effet des fractions de plantes sur la viabilité des fibroblastes NIH3T3	103
Figure 38: Effet des fractions de plantes sur la viabilité des mélanomes B16F10	103
Figure 39: Taux d'expression des gènes procollagène de type 1 (COL1A1) et de metalloproteinase matricielle-1(MMP-1) par les fractions de plantes dans les fibroblastes NIH/3T3.....	105
Figure 40: Taux d'expression des gènes TYR et TRP-1 par les fractions de plantes dans les mélanomes B16F10	106
Figure 41: Photoprotection des changements morphologiques des cellules NIH/3T3 par les fractions de plantes	108
Figure 42: Photoprotection des gènes du pro-collagène de type I et la matrice métalloprotéinase-1 dans les cellules NIH/3T3 des fractions de plantes	110
Figure 43: Photoprotection des gènes de TYR et TRP-1 dans les cellules B16F10 par les fractions de plantes	111
Figure 44: Fluorescence des fibroblastes NIH/3T3 après traitement par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB	112
Figure 45: Fluorescence des mélanomes B16F10 après traitement par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB	113
Figure 46: Taux d'expression de l'ARNm du facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf-2) et de l'hème oxygenase-1 (HO-1) dans les cellules NIH/3T3 prétraitées par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB	115
Figure 47: Taux d'expression de l'ARNm du facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf-2) et de l'hème oxygenase-1 (HO-1) dans les cellules B16F10 prétraitées par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB	116
Figure 48: Photographie des culots des mélanomes B16F10 après prétraitement par les fractions de plantes et irradiation par les rayons UVB.....	117
Figure 49: Taux de mélanine dans les cellules B16F10 après prétraitement par les fractions de plantes et irradiation par les rayons UVB.....	118
Figure 50: Chromatogramme HPLC des fractions actives sélectionnées HMH.....	121

Figure 51: Chromatogramme HPLC des fractions actives sélectionnées PAM	122
Figure 52: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M) avec le site actif élastase	126
Figure 53: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémidine (S) avec le site actif de l'élastase...	127
Figure 54: Mode de liaison du lupéole (E) avec le site actif de l'élastase.....	127
Figure 55: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M) avec le facteur de transcription AP-1	128
Figure 56: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémidine (L2) avec le facteur de transcription AP-1.....	129
Figure 57: Mode de liaison du lupéole (E) avec le facteur de transcription AP-1.....	129
Figure 58: Inhibition de l'élastase par les composés aux concentrations 10 et 100 µg/mL ...	130
Figure 59: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M) avec le site actif de la lipoxygénase.....	132
Figure 60: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémidine (S) avec le site actif de la lipoxygénase.....	133
Figure 61: Mode de liaison du lupéole (E) avec le site actif de la lipoxygénase.....	133
Figure 62: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M) avec le facteur de transcription NFκB	134
Figure 63: Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémidine (S) avec le facteur de transcription NFκB.....	135
Figure 64: Mode de liaison du lupéole (E) avec le facteur de transcription NFκB.....	135
Figure 65: Inhibition de la 15-lipoxygénase par les composés à différentes concentrations .	137
Figure 66: Inhibition de la tyrosinase par les composés aux concentrations de 100µg/mL...	139
Figure 67: Inhibition de la tyrosinase par les composés à différentes concentrations	139

RESUME

Les troubles associés au vieillissement cutané constituent un enjeu majeur de santé publique dans le monde. Par conséquent, des stratégies pour promouvoir un vieillissement en bonne santé sont recommandées et la recherche des nouveaux ingrédients d'origine naturelle intéresse de plus en plus les chercheurs de par le monde. *Harungana madagascariensis* Lam. (HM) et *Psorospermum aurantiacum* Engl. (PA) sont deux plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle pour les soins de la peau. Des travaux antérieurs ont démontré le potentiel antiviellissement cutané élevé de ces plantes. Dans le présent travail, les extraits bruts en mélange avec le chlorure de méthylène/méthanol (1:1, v/v) de ces plantes ont été soumis à un fractionnement bioguidé et l'effet des fractions sur quelques aspects biochimiques du vieillissement cutané a été testé *in vitro*. A cet effet, différentes fractions de chacun des extraits ont été préparées et étudiées pour leurs potentiels antioxydants, anti-inflammatoires et inhibiteurs des enzymes impliqués dans le vieillissement cutané (tyrosinase et élastase) par spectrophotométrie sur des modèles chimiques et cellulaires. Les fractions actives ont été analysées par les réactions de polymérase en chaîne après transcription inverse pour leurs effets d'inhibition sur les gènes impliqués dans la biosynthèse de la mélanine : tyrosinase (TYR) et *tyrosinase related protein-1* (TRP-1) et, dans la biosynthèse et la dégradation du collagène, en particulier les gènes de procollagène de type 1 (COL1A1) et de métalloprotéinase matricielle-1 (MMP-1) dans le modèle cellulaire de vieillissement cutané induit par des rayons UVB. Les structures des composés chimiques purifiés des fractions actives ont été déterminées par les techniques chromatographiques et spectrales. Enfin, un *docking* moléculaire a permis de prévoir les activités anti-élastase et anti-lipoxygénase des composés isolés, puis les activités ont été confirmées par spectrophotométrie *in vitro*. Comme résultats, la fraction hexanique d'HM (HMH) ($0,350 \pm 0,024$) à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ a montré une capacité de réduction supérieure à celle de la vitamine C ($0,290 \pm 0,009$). Aussi, la fraction au méthanol de PA (PAM) a fortement piégé les radicaux DPPH avec un pouvoir anti radicalaire de $22,29 \cdot 10^{-9} \pm 0,05$ mol DPPH/ μg d'extrait par rapport à la vitamine C ($13,61 \cdot 10^{-9} \pm 0,25$ mol DPPH/ μg d'extrait). Les fractions isolées ont inhibé l'élastase et la tyrosinase. La fraction à l'hexane de PA (PAH) a présenté l'activité anti-élastase la plus élevée avec une CI_{50} de 15,40 $\mu\text{g/mL}$. Les fractions HMH et PAH se sont révélées plus actives contre la 15-lipoxygénase avec les valeurs des CI_{50} respectives de 46,80 et 27,55 $\mu\text{g/mL}$, comparée à 24,55 $\mu\text{g/mL}$ pour la quercétine composé de référence. De plus, la fraction HMH a inhibé significativement ($p < 0,05$) la production de NO avec une CI_{50} de 65,55 $\mu\text{g/mL}$. Les fractions hexanique et méthanolique des deux plantes étant les plus actives ont été sélectionnées et ont protégé les cellules de peaux de souris de l'effet cytotoxique des rayonnements UVB, amélioré la biosynthèse du collagène en réduisant les taux d'expression des ARNm de MMP-1 et en augmentant les taux d'ARNm de COL1A1. Par ailleurs, ces fractions ont réduit la synthèse de la mélanine en inhibant l'expression des ARNm des gènes TYR et TRP-1; et ont inhibé le stress oxydatif intracellulaire en augmentant les taux d'expression d'ARNm des gènes antioxydants Nrf-2 et HO-1. Parmi les composés isolés de PAH, le lupéole a présenté une conformation stable avec l'élastase et a inhibé cet enzyme *in vitro*. Ces résultats confirment l'importance de l'utilisation de ces plantes dans la médecine traditionnelle locale et représentent ainsi un argument solide pour la valorisation de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* comme sources potentielles de composés actifs pouvant remplacer l'hydroquinone et les corticoïdes dans la prévention des dommages cutanés causés par les rayons UVB.

Mots clés : *Harungana madagascariensis*, *Psorospermum aurantiacum*, rayon UVB, mélanine, collagène, vieillissement cutané, stress oxydatif.

ABSTRACT

Disorders associated with skin aging are of major public health importance worldwide. Strategies to promote healthy aging are therefore recommended and the search of natural products for potential anti-skin aging activity is much needed. *Harungana madagascariensis* Lam. (HM) and *Psorospermum aurantiacum* Engl. (PA) are two medicinal plants used by traditional practitioners for skin care. Previous studies have shown the high anti-skin aging potential of these plants. In the present study, crude extracts obtained from a mixture of methylene chloride-methanol (1:1 v/v) of these plants were subjected to bio-guided fractionation and the effect of the isolated fractions on some biochemical factors of skin aging was assessed *in vitro*. For this purpose, different fractions of each extract were prepared and evaluated for their antioxidant and anti-inflammatory potentials, as well as their capacity to inhibit enzymes involved in skin aging (tyrosinase and elastase) by spectrophotometry. The inhibitory effects of active fractions on melanin biosynthesis genes were analyzed by quantifying the expression of tyrosinase (TYR) and tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) genes, as well as their effect on collagen biosynthesis and degradation genes, especially procollagen type-1 (COL1A1) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) on a skin aging model induced by UV-B irradiated cells using a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, compounds were purified from the most active fractions and their chemical structures were elucidated from corresponding spectral data. A study of the interactions between the isolated compounds and two target enzymes (elastase and 15-lipoxygenase) were analyzed using molecular docking; and were further confirmed by *in vitro* spectrophotometry.

The hexane fraction of HM (0.350 ± 0.024) showed better antioxidant activities at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ than ascorbic acid (0.290 ± 0.009). On the other hand, the PA methanol fraction exhibited the highest DPPH radical scavenging activity with an IC_{50} of $4.55 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ compared with ascorbic acid ($7.45 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$). The isolated fractions showed considerable elastase inhibitory activity (greater than 50% inhibition) whereas the hexane fraction of PA showed the highest anti-elastase activity with an IC_{50} of $15.40 \mu\text{g/mL}$. Although all the fractions showed tyrosinase inhibitory activity, the hexane fraction ($48 \pm 3.02\%$) of HM showed better tyrosinase inhibition. However, its activity was lower than that of standard ascorbic acid ($100 \pm 0.024\%$). In addition, the hexane fractions of HM and PA were found to inhibit 15-lipoxygenase with IC_{50} of 46.80 and 27.55 $\mu\text{g/mL}$ respectively compared to 24.55 $\mu\text{g/mL}$ for quercetin, the reference molecule. The hexane fraction of HM exhibited significant ($p < 0.05$) inhibitory activity on inflammatory NO production with IC_{50} of 65.55 $\mu\text{g/mL}$. The hexane and methanol fractions of both plants were selected because of their good activities and were found to be photoprotective by repressing UV-B-induced oxidative stress; mRNA levels of MMP-1, TYR, TRP-1 and by preventing UV-B-reduced mRNA levels of COL1A1 and the antioxidant genes (Nrf-2 and HO-1) when compared with vitamin C (Standard). Lupeol and 3-geranyloxyemodin were isolated from the hexane fraction of PA and showed the best interaction with elastase and 15-lipoxygenase respectively. These results validate the traditional use of *Harungana madagascariensis* and *Psorospermum aurantiacum* for treating skin ailments and thus represent a solid proof for their valorization as potential source of active compounds that could be a suitable alternative to the use of hydroquinone and corticosteroids in the prevention of UVB rays induced cutaneous damage.

Key words: *Harungana madagascariensis*, *Psorospermum aurantiacum*, UVB-radiation, melanin, collagen, skin aging, oxidative stress

INTRODUCTION GENERALE

1. Introduction

La peau, organe le plus large du corps humain, constitue une barrière protectrice contre les attaques extérieures. Elle est constamment exposée à diverses agressions externes causées par des microorganismes, l'exposition chronique aux rayonnements solaires, la pollution, les produits chimiques et les toxines (Negi *et al.*, 2012).

Ces agressions, suite à la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (EOR), sont à l'origine du stress oxydatif et de l'inflammation (Mathen *et al.*, 2014; Negi *et al.*, 2012). Ce qui entraînent inévitablement des lésions et accélèrent le vieillissement de la peau. Il s'agit d'un phénomène complexe caractérisé par des changements au niveau moléculaire tels que l'induction des gènes des enzymes de la tyrosinase (TYR) et de ses protéines apparentées *tyrosinase related protéine-1 et 2* (TRP-1 et TRP-2), du gène de la métalloprotéinase matricielle-1 (MMP-1), du gène de l'élastase et, une réduction du gène du collagène de type 1 (COL1A1) (Lee *et al.*, 2017; Wiegand *et al.*, 2017). Ces changements moléculaires provoquent au niveau physiologique pour les gènes de la famille des tyrosinases, une mélanogénèse incontrôlée étroitement associée aux troubles de la pigmentation (Lee *et al.*, 2017). Pour les gènes COL1A1 et MMP-1, on note en plus d'une perte de l'élasticité, la sécheresse cutanée, la mauvaise cicatrisation des plaies, des rides profondes et une réduction de la prolifération des fibroblastes (Swalwell *et al.*, 2012). Ces troubles cutanés sont accentuées par un niveau de stress oxydatif élevé dû à l'exposition de la peau aux rayons UV-B (280-320 nm) qui constituent l'une des composantes majeures du rayonnement solaire (Bravo *et al.*, 2017). Les désordres cutanés restent encore au 21^{ème} siècle, un problème majeur de santé publique dans le monde (Blume-Peytavi *et al.*, 2015). En effet, dans les pays en développement notamment en Afrique subsaharienne, ils représentent 30% de toutes les consultations (Kourouma *et al.*, 2016; Toure, 2010).

Pour réduire l'incidence du vieillissement cutané, les cellules de la peau sont équipées d'éléments moléculaires spéciaux tels que le facteur de transcription *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor-2* (Nrf2), impliqué dans la régulation des gènes des enzymes antioxydants (hème oxygenase-1, superoxyde dismutase, catalase...). Cependant, la surproduction de EOR entraîne une diminution significative de l'expression de ces gènes antioxydants conduisant à l'accumulation des dommages oxydatifs et des produits oxydants qui sont les marqueurs du stress oxydatif (Ben-Yehuda Greenwald *et al.*, 2016).

Les stratégies de ralentissement de l'incidence du vieillissement cutané utilisent entre autres: - les agents de blanchiment topique tels que l'hydroquinone, l'acide kojique, et l'acide azélaïque qui inhibent la tyrosinase et ses protéines apparentées et, diminuent le contenu épidermique en mélanine; – des agents antioxydants comme les vitamines A, E et C, la coenzyme Q10, l'acide alpha-lipoïque qui réduisent la formation de la mélanine, stimulent le renouvellement des fibroblastes et de l'épiderme ainsi que la synthèse du collagène (**Ebrahimzadeh et al., 2014; Hong et al., 2015**).

Si les agents antioxydants sont instables et nécessitent pour leur utilisation des stabilisateurs, les agents de blanchiment topique induisent des altérations mitochondriales, des dégradations des mélanosomes dans les mélanocytes, des inflammations et des irritations cutanées (**Hulya Celik Onar, 2012; Kim et al., 2011**).

Au regard du fait que le vieillissement cutané est un phénomène multifactoriel regroupant : le stress oxydatif, l'inflammation, l'hyperpigmentation, la dégradation du collagène et de l'élastine, aucun des composés ci-dessus, en plus des limites dégagées, ne peut à la fois agir sur tous ces facteurs. D'où le besoin de découvrir de nouvelles substances ayant à la fois des propriétés anti-mélanogénèse, antioxydant, antiinflammatoire et protecteur du collagène et de l'élastine contre les effets des rayons UV.

Les composés naturels sont connus pour être dotés d'un potentiel de protection contre les dégâts induits par les rayons UV (**Ben-Yehuda Greenwald et al., 2016; Bravo et al., 2017**). Ainsi, les capacités anti-âge cutané des extraits de plantes ont été rapportées par plusieurs équipes de recherche. À cet égard, il a été démontré que les polyphénols du thé vert et les fruits de *Platycarya strobilacea* empêchent les dommages oxydatifs et inhibent l'élastase et les métalloprotéinases matricielles (collagenase) *in vitro* (**Kim et al., 2011; Thring et al., 2009**). L'acide caféique et la quercétine ont été rapportés pour réduire le stress oxydatif et diminuer les rides sur la peau du visage (**Jadoon et al., 2015**). Les extraits de racine de *Pissenlit* sont connus pour leur activité inhibitrice de l'expression de la MMP-1 et stimulatrice de la synthèse du collagène de type I dans les cellules de la peau (**Yang et Li, 2015**). Il a été constaté que l'acide ellagique supprime le stress oxydatif et régule positivement les gènes Nrf-2 et HO-1 dans les cellules de la peau humaine (**Hseu et al., 2012**). Cependant, les composés efficaces avec des effets secondaires minimes restent rares et par conséquent, le criblage d'autres produits naturels au potentiel anti-âge cutané est plus que nécessaire.

Dans cette perspective, les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau par les communautés et les tradipraticiens des localités de Fouban et Nkol'Anga (Régions de l'Ouest et du Centre-Cameroun, respectivement) ont été répertoriées et criblées *in vitro* pour leurs propriétés anti-âge cutané (Manjia, 2012). *Harungana madagascariensis* (HM) et *Psorospermum aurantiacum* (PA) sont deux de ces plantes médicinales qui ont été sélectionnées pour leurs propriétés antioxydante et inhibitrice de l'élastase, une enzyme protéase à sérine impliquée dans la détérioration des composants de la peau dans diverses pathologies cutanées. De plus, une activité anti-tyrosinase des extraits bruts au mélange chlorure de méthylène/méthanol (1:1, v/v) de ces plantes a été décrite (Manjia, 2012). En plus de ces propriétés, ces plantes sont utilisées pour la cicatrisation des plaies, le traitement des allergies cutanées et des infections de la peau (Tchakam *et al.*, 2012). Il a été rapporté que les feuilles de PA possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes, tandis que les feuilles et écorces de HM présentent des activités antiprotozoaires, antibactériennes, anti-inflammatoires et antiplasmodiales (Lenta *et al.*, 2008; Iwalewa *et al.*, 2008; Tchakam *et al.*, 2012). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a décrit l'importance de ces plantes comme sources de potentiels agents ayant des propriétés anti-âge cutané. Pourtant, celles-ci contiendraient des fractions antioxydantes, anti-inflammatoires et, capables d'inhiber l'activité des enzymes (élastase et tyrosinase) en modulant l'expression des gènes impliqués dans le processus de vieillissement cutané. Par conséquent, la présente étude visait à évaluer l'effet des extraits et fractions des deux plantes sur les gènes de biosynthèse de la mélanine, du collagène et de dégradation du collagène en utilisant des cellules irradiées par les rayons UVB.

2. Hypothèse de recherche

Les fractions issues des extraits bruts de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum* sont actives sur quelques aspects biochimiques du vieillissement cutané : le stress oxydatif, l'inflammation, la surproduction de la mélanine, et la dégradation du collagène.

3. Objectifs

3.1. Objectif général

L'objectif général de ce travail a été d'étudier *in vitro* l'effet bioguidé de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum* sur quelques aspects biochimiques du vieillissement cutané : le stress oxydatif, l'inflammation, la surproduction de la mélanine, et la dégradation du collagène.

3.2 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques consistaient à déterminer :

- les fractions de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* possédant à la fois un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase ;
- les fractions actives de plantes qui protègent les cellules du vieillissement cutané dans le modèle induit par les rayonnements UVB ;
- le profil phytochimique des fractions d'intérêt et rechercher le support des activités par l'étude de l'inhibition de l'élastase, la tyrosinase et de l'inflammation par quelques molécules isolées.

Ces objectifs sont basés sur les hypothèses suivantes :

Hypothèse 1 : Les fractions de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* exercent un potentiel antiviellissement cutané en limitant à la fois l'inflammation, le stress oxydatif et en inhibant les enzymes élastase et tyrosinase

Hypothèse 2 : Les fractions de plantes ayant un potentiel antiviellissement cutané protègent les cellules de peau contre le vieillissement cutané dans le modèle induit par les rayonnements UVB, par inhibition des gènes de biosynthèse de la mélanine, de dégradation du collagène ; par activation des gènes de biosynthèse du collagène et par réduction du stress oxydatif intracellulaire.

Hypothèse 3 : Il existe des composés dans les fractions actives qui sont le support des activités obtenues.

**CHAPITRE I : REVUE DE
LITTERATURE**

I. Généralités sur l'anatomie, l'histologie et le fonctionnement de la peau.

I.1- Anatomie et Histologie

De par sa surface et son poids, la peau est l'organe le plus large et le plus lourd de l'être humain avec une surface de 2 m² chez l'adulte, et 1/3 du poids de l'organisme. Elle a une structure très complexe telle qu'illustré ci-dessous.

Elle est composée de 3 couches superposées sur 3 mm d'épaisseur de structures différentes et aux fonctions bien spécifiques : la plus superficielle est l'épiderme, puis viennent respectivement le derme et l'hypoderme (figure 1). A ces couches s'ajoutent les éléments annexes représentés par les cheveux, les poils, les ongles, les glandes sudoripares et les glandes sébacées (Ko *et al.*, 2011).

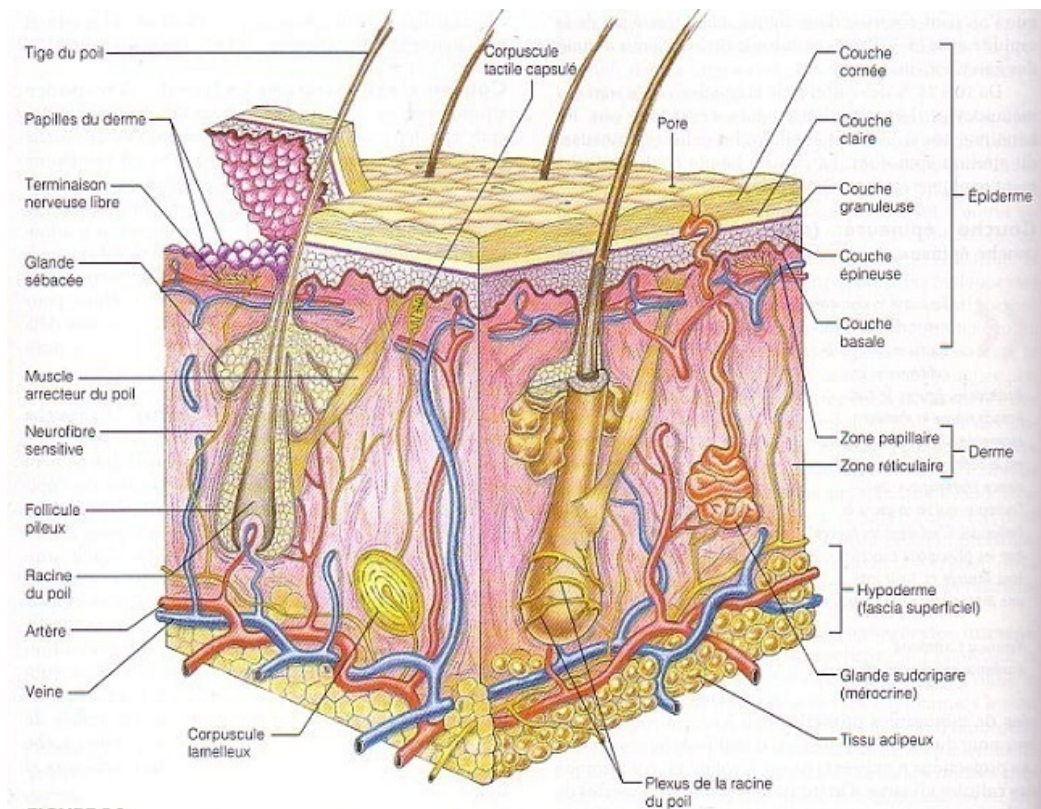


Figure 1 : Schéma de la peau (Marieb, 1999)

I.1.1- L'épiderme

L'épiderme est un épithélium de protection le plus externe, stratifié, kératinisé non vascularisé mais innervé. Les éléments nécessaires à son métabolisme lui parviennent par diffusion à partir des capillaires dermiques ou encore par un apport extérieur. Il est recouvert d'un film de surface, « le film hydrolipidique » constitué principalement de lipides et d'eau jouant un rôle dans l'hydratation, la protection, l'aspect et l'odeur de chaque individu. Son épaisseur est en moyenne d'environ 0,10 mm et varie selon les zones du corps. Il est constitué de quatre types de cellules: les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et de Merkel (Ng et Lau, 2015).

I.1.1.1- Les Kératinocytes

Les kératinocytes représentent 80% des cellules de l'épiderme et assurent quatre grandes fonctions à savoir : la cohésion de l'épiderme, la fonction de barrière entre les milieux intérieur et extérieur, la protection contre les radiations lumineuses et sont aussi impliquées dans la régulation des processus de réparation cutanée, de cicatrisation via la sécrétion de facteurs de croissance. En microscopie optique, les kératinocytes forment quatre couches: (Hirobe, 2014) la couche basale la plus profonde qui assure le renouvellement de l'épiderme et abrite les mélanocytes qui fabriquent la mélanine; la couche de Malpighi qui assure l'imperméabilité de la peau et est constituée des cellules chargées de kératine qui interviennent dans la fonction de barrière du revêtement cutané; la couche granuleuse composée des grains de kératine en début d'accolement et enfin la couche cornée (stratum corneum) formée des cornéocytes ou kératinocytes matures constitués en grande partie de kératine. La fonction de barrière est principalement assurée par cette dernière grâce aux lipides qu'elle renferme. Elle régule aussi le passage de l'eau à travers la peau et maintient l'hydratation cutanée (D'Mello *et al.*, 2016).

I.1.1.2- Les Mélanocytes

Les mélanocytes se situent entre les kératinocytes basaux de l'épiderme. Ces cellules constituent la deuxième grande population cellulaire de l'épiderme et interviennent dans la synthèse des mélanines dans des organites spécialisés appelés mélanosomes. Les mélanosomes contenus dans les mélanocytes migrent le long des dendrites pour être transmis aux kératinocytes. Ils produisent deux sortes de mélanine, l'Eumélanine de couleur brun-noir et la phéomélanine de couleur jaune-orange, qui ont un rôle photo protecteur (D'Mello *et al.*, 2016). La proportion et la taille de ces pigments donnent la grande diversité des couleurs de la

peau. La synthèse de mélanine appelée mélanogénèse s'effectue en permanence et est fortement stimulée par les rayons ultraviolets (UV). Cette biosynthèse (figure 2) utilise la tyrosine comme substrat qui est oxydée en dopaquinone sous l'action de la tyrosinase. Pour la suite, la dopaquinone emprunte la voie des phéomélanines en présence d'une grande quantité de cystéine sinon elle s'oriente dans la voie des eumélanines contrôlée par les enzymes *tyrosinase related protein 1* (TRP-1) et la dopachrome tautomérase (TRP-2) (Hong *et al.*, 2015; Ko *et al.*, 2011).

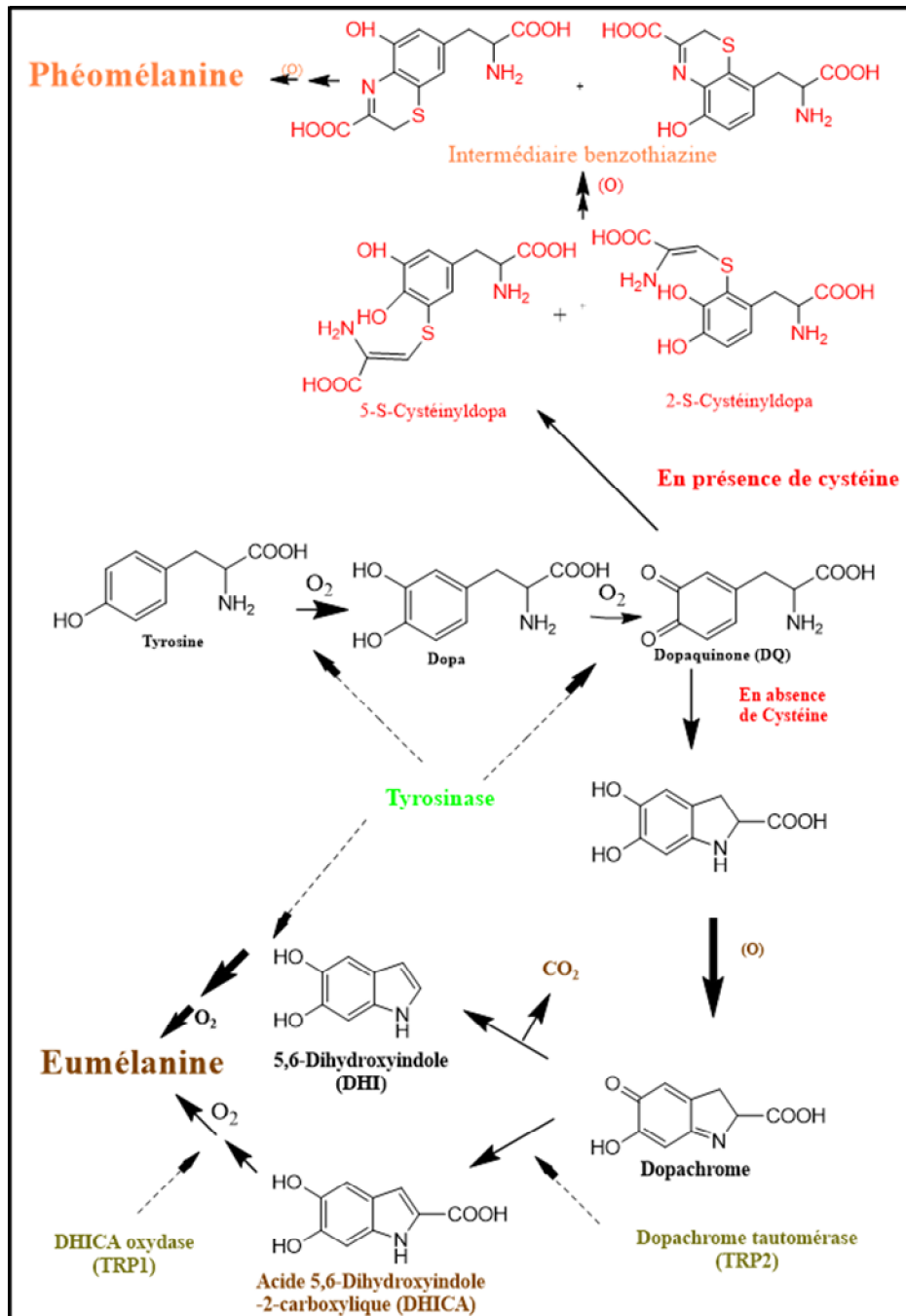


Figure 2 : Biosynthèse de la mélanine (Hong *et al.*, 2015)

L'enzyme tyrosinase (TYR), enzyme limitante de la mélanogénèse, est commune aux deux voies de synthèse, alors que la DOPAchrome tautomérase codée par le gène TRP-2 et la DHICA oxydase ou encore TRP-1 (*Tyrosinase Related protein*) sont spécifiques de la production d'eumélanine (Zonunsanga, 2015). L'enzyme TRP-1 aurait un rôle stabilisateur de l'activité de la tyrosinase (Videira *et al.*, 2013). La concentration des différentes enzymes est un facteur essentiel dans le contrôle de la balance eumélanine/phéomélanine et donc dans la pigmentation de la peau. La mutation de ces facteurs (TYR, TRP1) est critique pour la pigmentation et conduit à l'albinisme oculaire cutané (OCA). La mutation du gène TYR est associée à l'albinisme oculaire cutané de type 1 et la mutation de TRP1 est associée à l'albinisme oculaire cutané de type 3 (Videira *et al.*, 2013).

I.1.1.3- Les cellules de Langerhans

Ces cellules représentent 3 à 8% des cellules épidermiques et sont appelées les macrophages de l'épiderme. Elles sont issues de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse et appartiennent au groupe des cellules présentatrices d'antigène. Leur fonction est de capturer les antigènes, de les apprêter et de les présenter aux lymphocytes T (Marieb, 1999). Elles sont très vulnérables aux rayons UV et possèdent des marqueurs spécifiques que n'ont pas les autres cellules dendritiques. Ces cellules ont un rôle de protection vis-à-vis des particules et micro-organismes étrangers, et également un rôle dans les phénomènes immunitaires et dans le processus anti-inflammatoire épidermique en stimulant la production de certains lymphocytes. Elles ont aussi un rôle dans la régulation des mitoses.

I.1.1.4- Les cellules de Merkel

Originaires des crêtes neurales, ces cellules constituent la population cellulaire minoritaire de l'épiderme. Leur distribution corporelle est irrégulière (nombreuses sur les lèvres et les zones palmaires et plantaires). Elles sont en contact avec un neurone sensitif (corpuscule tactile non capsulé ou encore disque de Merkel) et l'ensemble représente un récepteur sensoriel cutané. Ces mécanorécepteurs sont en relation avec des terminaisons nerveuses libres. Ils enregistrent les moindres vibrations à l'intérieur de l'épiderme et les transmettent à ces terminaisons nerveuses pour en informer le cerveau (Marieb, 1999).

I.1.2- Le derme

Le derme est 10 à 40 fois plus épais que l'épiderme et à la différence de l'épiderme, il est vascularisé, ce qui lui permet non seulement d'apporter de l'énergie et des nutriments à

l'épiderme, mais aussi de jouer un rôle primordial dans la thermorégulation et la cicatrisation. Il est également le tissu de soutien qui donne sa consistance à la peau. Il est compressible, élastique et confère à la peau sa résistance et son élasticité : c'est le support solide de la peau. Sur le plan architectural, le derme est constitué de deux zones: l'une superficielle appelée « derme papillaire » et l'autre profonde dénommée « derme réticulaire » (**Ng et Lau, 2015**).

Le derme papillaire constitue environ un cinquième de l'épaisseur totale du derme et se compose de tissu conjonctif lâche, richement vascularisé et innervé. Ce tissu se caractérise par la présence entre ses cellules d'une très abondante matrice extracellulaire (MEC) dans laquelle on retrouve des fibres fines de collagène et d'élastine baignant dans l'acide hyaluronique. Les cellules principales du tissu conjonctif sont les fibroblastes. Elles synthétisent les macromolécules protéiques et polysaccharidiques de la MEC ainsi que d'autres nombreuses autres molécules (cytokines, facteurs de croissance, enzymes). Le tissu conjonctif est aussi le siège des cellules libres du système immunitaire (lymphocytes, plasmocytes, monocytes, macrophages, granulocytes et mastocytes) intervenant dans les réactions inflammatoires et dans les phénomènes immunitaires ainsi que dans les processus de cicatrisation (par prolifération des fibroblastes et production des macromolécules de la MEC). Le derme papillaire renferme aussi des corpuscules tactiles capsulés (terminaisons nerveuses enveloppées d'une capsule) sensibles au toucher fin et des corpuscules tactiles non capsulés (terminaisons nerveuses libres) associées aux sensations de chaleur, de froid, de douleur, de chatouillement et de démangeaison (**Belbayane, 2015**).

Le derme réticulaire constitue 80% du derme et est composé de tissu conjonctif dense riche en fibres, pauvre en fibroblastes et en substance fondamentale. Il a une fonction essentiellement mécanique. Ce tissu conjonctif irrégulier contient les faisceaux de fibre de collagène épaisse et quelques grosses fibres élastiques. Quelques adipocytes, des follicules pileux, des nerfs, des glandes sébacées et des glandes sudoripares occupent l'espace entre les fibres. L'association de fibres collagènes et de fibres élastiques dans le derme réticulaire confère à la peau sa résistance, son extensibilité (sa capacité à s'étirer) et son élasticité (sa capacité à reprendre sa forme initiale après un étirement) (**Ko et al., 2011; Sultana et Lee, 2007a**).

I.1.2.1- Les cellules du derme

a-) Les fibroblastes

Les principales cellules constituant le derme sont des fibrocytes, dénommés fibroblastes lorsqu'ils reprennent une activité proliférative. Les fibrocytes (B) sont des cellules plus fusiformes, ayant un noyau plus condensé, un cytoplasme moins abondant et plus pauvre en organites que celui des fibroblastes (A) (figure 3). Les fibroblastes sont les cellules les plus abondantes, elles sont fixes, isolées, d'aspect fusiforme (renflées au milieu), responsables de la synthèse et de l'entretien du matériel extracellulaire puisque la richesse de son cytoplasme en organites lui permet de synthétiser le collagène, l'élastine, la substance fondamentale, les glycoprotéines de structure ainsi que les métalloprotéinases matricielles. Cette activité est particulièrement intense au cours des phénomènes de cicatrisation (Nusgens and Colige, 2008).

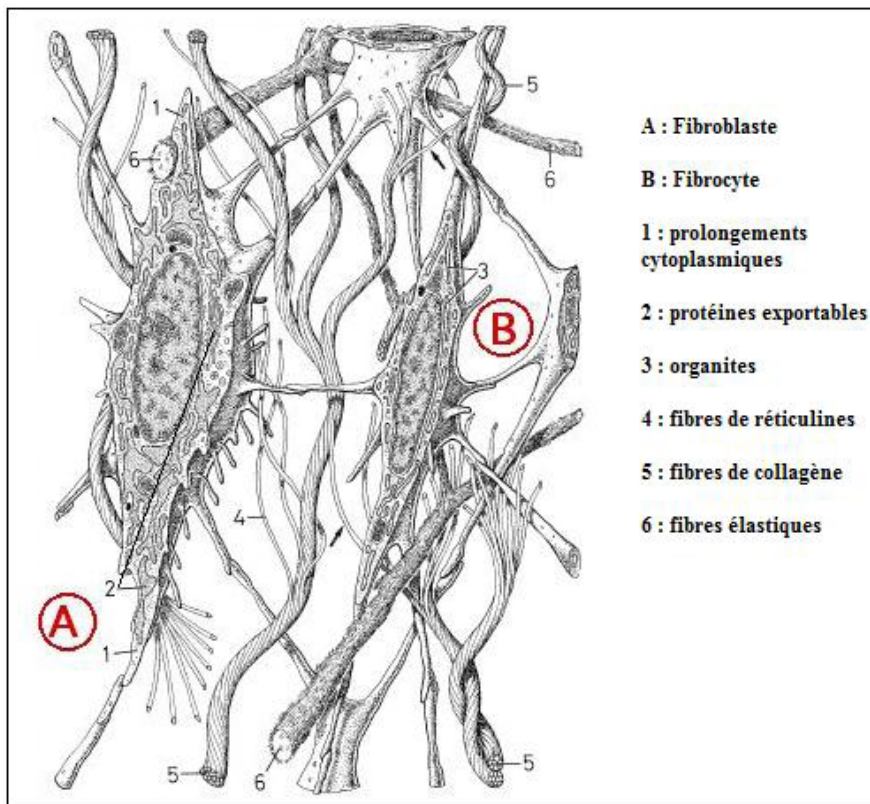


Figure 3 : Fibroblaste (A) et fibrocyte (B) (Nusgens and Colige, 2008).

- **Le collagène**

Le collagène est une protéine fibreuse, la plus abondante du corps humain ; au niveau du derme, c'est le constituant le plus important (> 90 %). Sa principale fonction est de maintenir

la résistance et l'intégrité structurale. Il existe 19 types de collagènes différents et le collagène de types I est le plus abondant dans le derme.

Les collagènes sont sécrétés par les fibroblastes dans le milieu extracellulaire sous forme de procollagène constitué de trois chaînes polypeptidiques α qui forment une structure hélicoïdale et comportent deux propeptides supplémentaires à leurs extrémités N et C terminales. La biosynthèse du collagène de type I par les fibroblastes s'effectue en plusieurs étapes (figure 4). Tout d'abord, la transcription de gènes codant pour chacune des hélices constitutives du collagène (COL1A1 et COL1A2) est activée par des facteurs de croissance et des cytokines. Cette transcription dans le noyau permet la synthèse des acides ribonucléiques messagers (ARNm) qui sont ensuite traduits en préprocollagènes par les ribosomes (**Nusgens and Colige, 2008**).

La protéine est synthétisée dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux situé dans le cytoplasme. Après élimination du peptide signal N-terminal par des peptidases signaux (SP), le procollagène a une structure primaire composée de chaînes polypeptidiques ininterrompues ayant 300 motifs caractéristiques Gly-X-Y du collagène. Dans l'appareil de Golgi, les procollagènes subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles dont: L'hydroxylation de certains résidus Pro par la prolyl 3-hydroxylase ou la prolyl 4-hydroxylase (PH); l'hydroxylation de certains résidus Lys par la lysyl hydroxylase (LH); la glycosylation de certains résidus d'hydroxy-Lys en galactosylhydroxy-Lys ou glucosylgalactosylhydroxy-Lys par l'hydroxylysyl lactosyltransférase et la galactosylhydroxylysyl glucosyltransférase (GT) et enfin la glycosylation de certains résidus Asp des propeptides (C- et N-). À ce stade, la structure secondaire du domaine central du procollagène est une hélice α .

La structure tertiaire en triple hélice s'obtient à partir de trois chaînes de procollagènes qui s'alignent autour de leurs C-propeptides (**Nusgens and Colige, 2008**). Dans le milieu extracellulaire, les propeptides sont éliminés par clivage pour donner les molécules de collagène. Ces dernières ont une structure hélicoïdale rigide à trois brins. Ces molécules sont riches en proline, en hydroxyproline et en glycine. Ces dernières permettent aux trois chaînes α hélicoïdales de s'enrouler étroitement pour former la superhélice de collagène. Les molécules trihélicoïdales de collagène fibrillaire s'associent en s'alignant côte à côte pour former des fibrilles de 50 à 200 nm de diamètre, puis ces fibrilles s'agrègent en faisceaux de plus grande dimension, formant des fibres de collagène de plusieurs micromètres de diamètre.

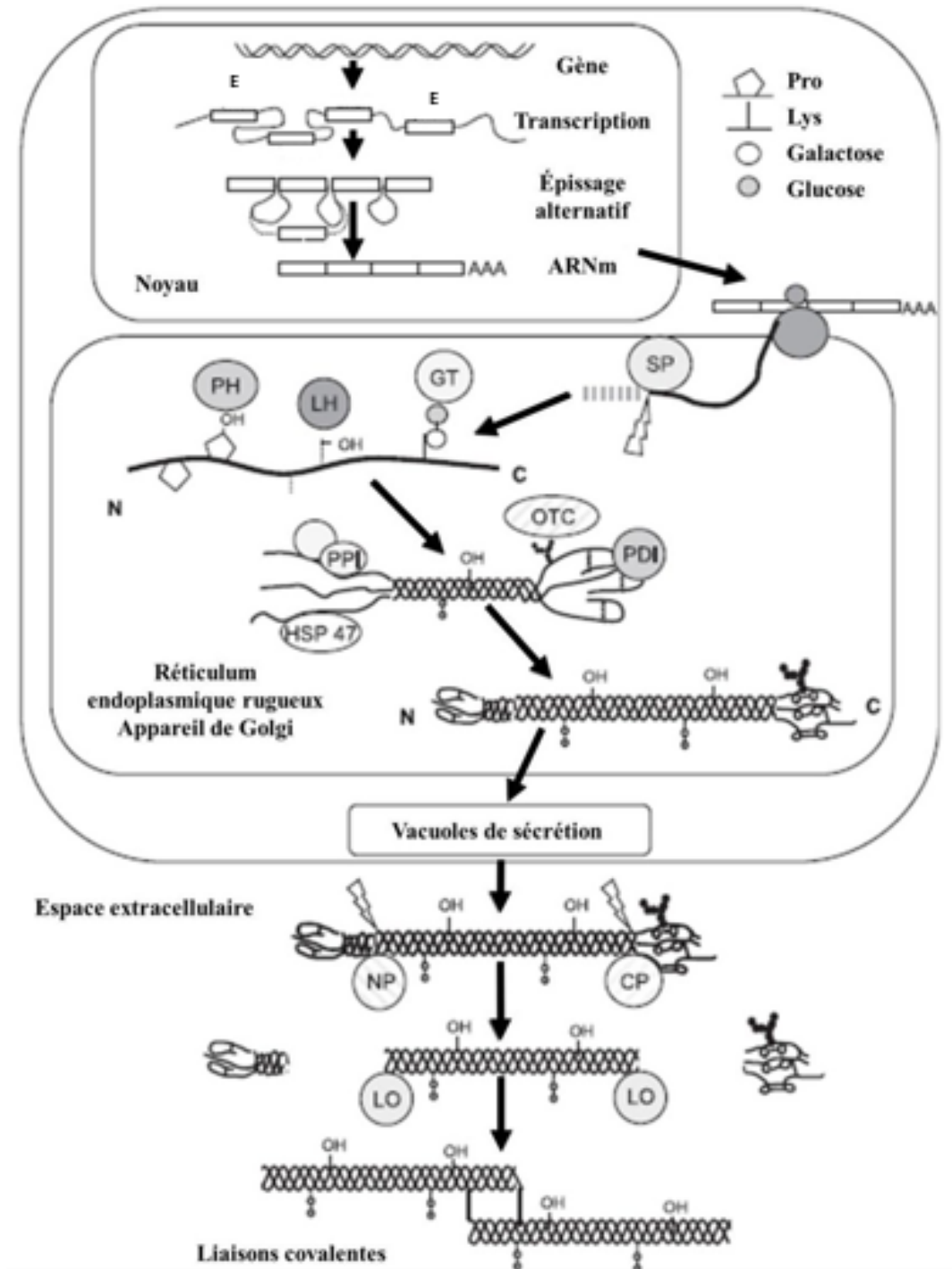


Figure 4 : Synthèse du collagène de type I (Nusgens and Colige, 2008)

CP : C-procollagénase ; *GT* : hydroxyllysyl galactosyltransférase/galactosyl-hydroxyllysyl glucosyltransférase ; *HSP47* : protéine de choc thermique 47 ; *LH* : lysyl hydroxylase ; *LO* : lysyl oxydase ; *NP* : N-procollagénase ; *OTC* : complexe oligosaccharyl transférase ; *PDI* : protéine disulfure isomérase ; *PH* : prolyl hydroxylase ; *PPI* : peptidyl prolyl cis-trans-isomérase ; *SP* : peptidase signal ; *E* : exon.

- **L'élastine**

L'élastine est une molécule protéique non glycosylée, hydrophobe, constituée de 830 acides aminés notamment la proline et la glycine. Elle diffère du collagène par sa faible teneur en OH-proline mais surtout par la présence de desmosine et isodesmosine, acides aminés caractéristiques de l'élastine. Les fibres d'élastine sont produites par les fibroblastes sous forme de tropoélastine qui se polymérisent dans la substance fondamentale grâce à une glycoprotéine la fibrilline. Il existe trois sortes de fibres élastiques à savoir : les fibres oxytalanes, les fibres d'élaunine (immatures) et les fibres élastiques matures. Les fibres d'oxytalanes sont situées transversalement par rapport aux autres fibres d'élastines et sont les premières à disparaître au cours du vieillissement. L'élastine a pour rôle principal l'élasticité de la peau. Grâce à elle et surtout aux tropoélastines qui la composent, la peau peut être étirée jusqu'à 120 à 150 % et revenir à sa position de départ. L'élastine sert aussi de réservoir aux facteurs de croissance en latence. Des modifications de ces fibres seront observées dans le processus de cicatrisation et dans certaines affections comme l'élastose solaire, le lupus et les vergetures (**Elma, 2016**).

- **Les protéoglycanes**

Les protéoglycanes sont des protéines reliées par des liaisons covalentes à des chaînes glycosaminoglycanes. Cet ensemble permet d'avoir une substance fondamentale très hydratée et souple, ce qui rend la diffusion des métabolites possible. Parmi les glycosaminoglycanes, nous retrouvons l'acide hyaluronique qui est le plus abondant, le chondroïtine sulfate, l'héparane sulfate, héparine et kératane-sulfate. La décorine et la versicare sont les principales protéoglycanes du derme. L'acide hyaluronique est une molécule très hydrophile. Son rôle principal est l'hydratation. Il retient l'eau et certains ions positifs. Il a aussi un rôle dans la migration des cellules, la différenciation des tissus, la croissance, l'angiogenèse et la régulation des cellules immunitaires. Il intervient de façon positive aussi au niveau de la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes dermiques (**Elma, 2016**).

- **Les glycoprotéines**

Parmi les glycoprotéines de structure et d'adhérence, nous retrouvons : la fibronectine cellulaire (différente de la fibronectine plasmatique qui se trouve dans la circulation sanguine), la tenascine et la laminine. La fibronectine permet la migration des fibroblastes et des macrophages vers les plaies pour accélérer la guérison (**Elma, 2016**).

✓ **Les Métalloprotéinases matricielles (MMPs)**

Durant leur différenciation, les fibroblastes et les cellules inflammatoires sécrètent des MMPs qui sont impliqués dans la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire (**Pittayapruek *et al.*, 2016**). Les MMPs forment une famille de proteases homologues synthétisées sous forme inactive (pro-enzyme) et activées par maturation proteolytique dans le milieu extracellulaire. Leur activité nécessite la fixation de Ca^{++} et de Zn^{++} . Les différentes métalloprotéinases sont classées en sous-familles qui ont des spécificités de substrats différentes (**Pittayapruek *et al.*, 2016**) :

- les collagénases interstitielles (MMP1, MMP8, MMP13) ont une étroite spécificité de substrat et clivent spécifiquement les collagènes fibrillaires (type I, II et III) en 2 fragments, provoquant le déroulement de l'hélice ce qui aboutit au collagène dénaturé (ce dernier est aussi appelé gélatine).
- les gélatinases (MMP2, MMP9) interviennent ensuite pour dégrader les fragments de collagène dénaturé. Les gélatinases dégradent également les collagènes de type IV, Vet VII, l'élastine et la fibronectine.
- les stromélysines (MMP3, MMP10, MMP11) et la matrilysine (MMP7) ont une activité protéolytique large et dégradent le noyau protéique des protéoglycanes, la laminine et la fibronectine.
- la métallo-élastase (MMP12) dégrade l'élastine.
- les métalloprotéinases de type membranaire ou MT-MMP (MMP15 à MMP25 et MT1 à MT6-MMP) dégradent de nombreux composés de la matrice extracellulaire
- les autres MMP (MMP 19 à 28) ne peuvent être classées dans aucune des familles citées ci-dessus

L'équilibre entre la synthèse des composants de la matrice extracellulaire et leur dégradation par des enzymes spécialisées permettent d'assurer le renouvellement de la matrice, ce qui intervient aussi dans un certain nombre de processus physiologiques.

b-) Les macrophages et les cellules dendritiques

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée. Ils ont un rôle de défense et interviennent lors d'intrusion d'un corps étranger. Ils sont activés par plusieurs facteurs comme l'interféron γ , les cytokines pro-inflammatoires, les protéines bactériennes, l'hypoxie.

Ils jouent un rôle dans l'orchestration des réponses immunitaires et à la réorganisation des tissus par recrutement des cellules inflammatoires, stimulation de l'angiogenèse et synthèse des fibroblastes. Ils participent aussi à l'élimination des cellules apoptotiques ou sénescents. Ils sécrètent des métalloprotéinases, dégradant ainsi la matrice extracellulaire (MEC) en régulant la phase inflammatoire, la phase de contraction, la prolifération des fibroblastes et le dépôt de la MEC. Ils interviennent en modulant les modifications vasculaires lors de la cicatrisation. Les cellules dendritiques du derme sont des cellules présentatrices de l'antigène qui peuvent se transformer en cellules de Langerhans en présence de certains facteurs et des cellules pluripotentes qui pourront selon leur milieu avoir des propriétés de phagocytose ou de présentation de l'antigène (**Belbayane, 2015**).

c-) Les mastocytes

Les mastocytes sont d'origine hématopoïétique. Ils se situent surtout près de la jonction dermo-épidermique et représentent 2 à 8% des cellules du derme. Ils ont un rôle dans les réactions allergiques. En effet, ils possèdent des médiateurs chimiques comme l'histamine qu'ils libèrent lors de contact avec un allergène. Ils synthétisent aussi des cytokines et des chimiokines par la même activation ainsi que d'autres médiateurs (prostaglandines, leucotriènes) qui ont aussi un rôle dans les réactions allergiques et inflammatoires. Les mastocytes interviennent dans la cicatrisation des plaies et le remodelage des tissus (**Belbayane, 2015**).

I.1.3- L'hypoderme

L'hypoderme aussi appelé tissu sous-cutané, relie la peau aux organes sous-jacents et protège l'organisme des variations thermiques et des chocs mécaniques. Il est constitué d'un tissu conjonctif très lâche, dans lequel se trouvent de nombreuses cellules adipeuses (adipocytes) qui stockent une grande quantité de lipides. La graisse contenue dans les adipocytes peut être mobilisée sous forme d'énergie en cas d'effort intense ou prolongé ou de jeûne. Cette graisse participe aussi à la régulation thermique en jouant un rôle d'isolant passif et réduisant ainsi les échanges de température avec l'extérieur (**Marieb, 1999**).

I.1.4- Annexes cutanées

Les annexes sont toutes d'origine épidermique mais situées dans le derme et l'hypoderme (**Marieb, 1999**). Cette position est très importante car les annexes constituent

une source de cellules profondément ancrées dans la peau capable de régénérer l'épiderme lorsque ce dernier a été détruit ou abîmé par une lésion.

I.1.4.1- Les glandes sudoripares

Elles fabriquent la sueur et jouent un rôle primordial dans la thermorégulation (la lutte contre la chaleur) grâce à la sudation (ou transpiration). Elles sont de deux types : les glandes eccrines qui synthétisent une sueur aqueuse salée et les glandes apocrines qui synthétisent une sueur plus épaisse, lipidique alcaline et odorante (**Marieb, 1999**).

I.1.4.2- Les follicules pilo-sébacés et les ongles

En général, tous les poils sont associés à des glandes sébacées formant ainsi les follicules pilo-sébacés. Par contre, les glandes sébacées ne sont pas toutes associées à des poils. Les glandes sébacées sécrètent un liquide (sébum) aux propriétés antifongiques riche en triglycérides. Ce liquide protège la peau, les poils et les cheveux contre le dessèchement et les petites écorchures. Le follicule pileux quant à lui, est constitué de plusieurs éléments : le poil, le muscle pilo-moteur et le bulbe pileux (**Marieb, 1999**).

Le poil (ou tige pileuse) constitue la partie visible du follicule pileux ; le muscle pilo-moteur (ou arrecteur ou horripilateur) est un petit muscle lisse qui se contracte sous l'effet du froid, de la peur ou autres sensations. Sa contraction provoque le redressement du poil: c'est la chair de poule ou l'horripilation. Le bulbe pileux est situé à la base et assure la croissance du poil.

L'ongle est une modification écailleuse de l'épiderme qui recouvre la face dorsale du bout du doigt ou de l'orteil.

I.2- Fonctions de la peau

Chaque cellule, chaque couche cutanée et tous les éléments constituant la peau vont avoir une fonction et un métabolisme différent, en relation étroite avec leur architecture et leur milieu environnant. Ceci confère à la peau de multiples fonctions physiologiques (**Hornig et al., 2017; Hulya Celik Onar, 2012; Zhang et Duan, 2018**).

❖ Rôle de protection.

La peau a une fonction de barrière mécanique (coupures, chocs, écrasements, piqûres), barrière chimique (substances chimiques), barrière infectieuse (antimicrobienne et immunitaire) et Photoprotection (rayonnements UV).

❖ Rôle dans la thermorégulation

La peau contrôle la température interne du corps en luttant contre le froid et contre la chaleur (Hornig *et al.*, 2017).

❖ Rôle métabolique

La peau synthétise la vitamine D3 et les lipides. Les lipides sont stockés sous forme de triglycérides dans les adipocytes présents dans l'hypoderme et, pourront être hydrolysés en acides gras et glycérol (Hulya Celik Onar, 2012).

❖ Rôle Sensoriel

Différentes terminaisons nerveuses et récepteurs sont présents au niveau de la peau et réagissent chacun à différents stimuli. Ce qui va permettre la perception de la douleur, des sensations tactiles, de pression et de la chaleur (Zhang et Duan, 2018).

❖ Echange avec l'extérieur

Grâce à la présence de pores, la peau permet la diffusion de l'eau et les solutés, ce qui facilite l'élimination des déchets (Zhang et Duan, 2018).

Afin de pouvoir réaliser l'intégralité de ces fonctions citées précédemment, la peau doit être en parfait état car elle est le reflet de la bonne santé de notre organisme. Elle possède donc différents systèmes de régulation qui vont lui permettre de conserver un état optimal. Tout au long de la vie, ces mécanismes de régulation vont devenir de moins en moins précis et des dégâts ou déchets vont s'accumuler, pour, *in fine*, modifier le phénotype cellulaire et perturber l'équilibre qui va conduire à une fragilité de la peau et aboutir au vieillissement cutané (Lee *et al.*, 2019).

II- Le vieillissement cutané

Le vieillissement cutané est l'ensemble des mécanismes biologiques qui s'accompagnent des troubles psychologiques, des modifications physiologiques et anatomiques de la peau au fil des années. Il est un processus naturel et les mécanismes moléculaires impliqués sont les mêmes que pour les autres organes, à des degrés variables, puisque la peau est directement exposée aux agressions externes. On distingue alors deux types de vieillissement cutané : le vieillissement intrinsèque qui résulte des facteurs génétiques et le vieillissement extrinsèque dû aux facteurs environnementaux. Les deux types de vieillissement s'additionnent pour donner lieu à des changements cutanés caractéristiques (figure 5) (Mathen *et al.*, 2014; Negi *et al.*, 2012; Tobin, 2017)

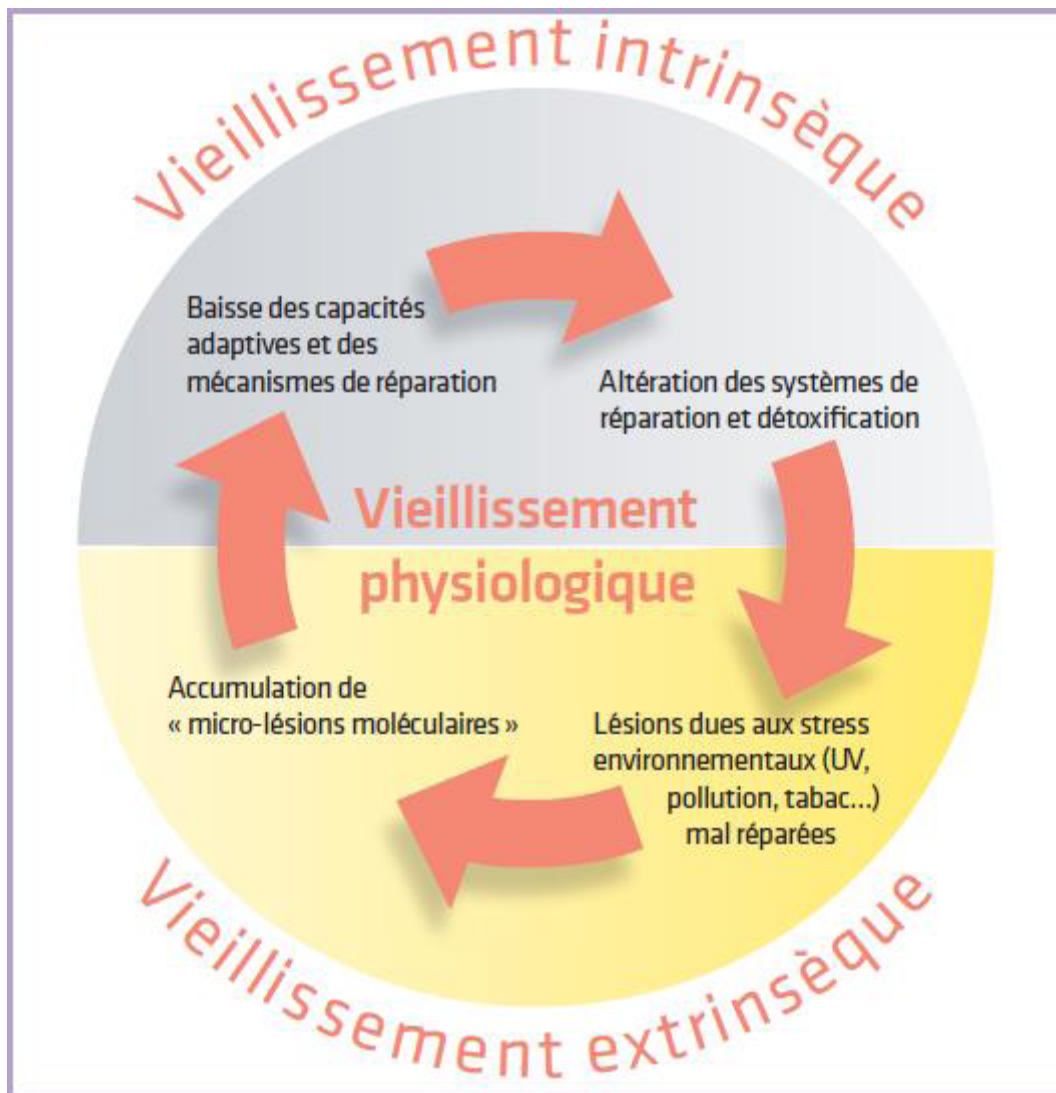


Figure 5 : Représentation schématique du processus d'auto-amplification impliqué dans le vieillissement cutané (Negi *et al.*, 2012; Tobin, 2017).

II.1- Vieillissement intrinsèque

Le vieillissement intrinsèque est un processus naturel et physiologique qui progresse lentement et de façon inéluctable largement déterminé par les gènes. A ce jour, plusieurs théories tentent d'expliquer son origine dont la plus importante est la perte des télomères et à côté de celle-ci les changements hormonaux ainsi que les facteurs enzymatiques etc... (figure 6) (Assaf *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2010).

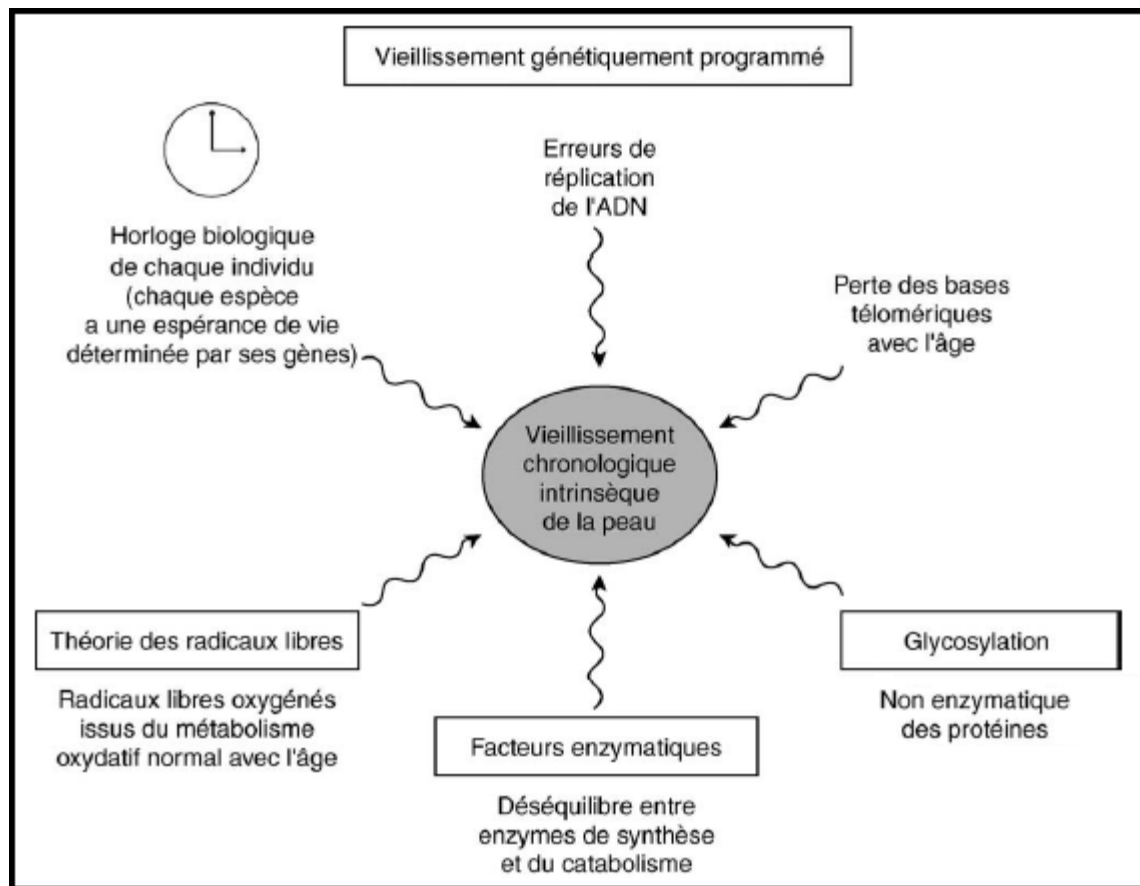


Figure 6 : Mécanismes du vieillissement cutané intrinsèque (Assaf *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2010).

II.1.1-La perte des télomères

Le vieillissement intrinsèque ou chronologique est largement déterminé par les gènes. Il est lié à une altération des mécanismes de réparation ou de maintenance des cellules et est contrôlé par une sorte d'horloge biologique individuelle génétiquement programmée : les chromosomes. Ces derniers sont porteurs du patrimoine génétique de l'individu et se raccourcissent à chaque division cellulaire à cause de la perte progressive des télomères. Une enzyme, la télomérase permet de réparer ces pertes chromosomiques engendrées par le renouvellement cellulaire. Cependant, l'activité de la télomérase est beaucoup plus faible dans les tissus épidermiques et les fibroblastes. Ceci a pour conséquence la sénescence des cellules cutanées. Ces cellules sénescents de la peau deviennent vulnérables à l'apoptose et gèrent mal le stress oxydatif (figure 7). Les fibroblastes perdraient ainsi leur capacité de prolifération et de synthèse de la matrice extracellulaire. Parallèlement, la sécrétion de protéases serait accrue et conduirait à une destruction inappropriée de la matrice extracellulaire (**Buckingham et Klingelutz, 2011**). D'autre part, les cellules cutanées font partie des cellules les plus

rapides de l'organisme à se diviser. Les dommages de l'ADN s'accroissent avec l'âge, cette réplication rapide les rend par conséquent plus vulnérables à la sénescence répliquative.

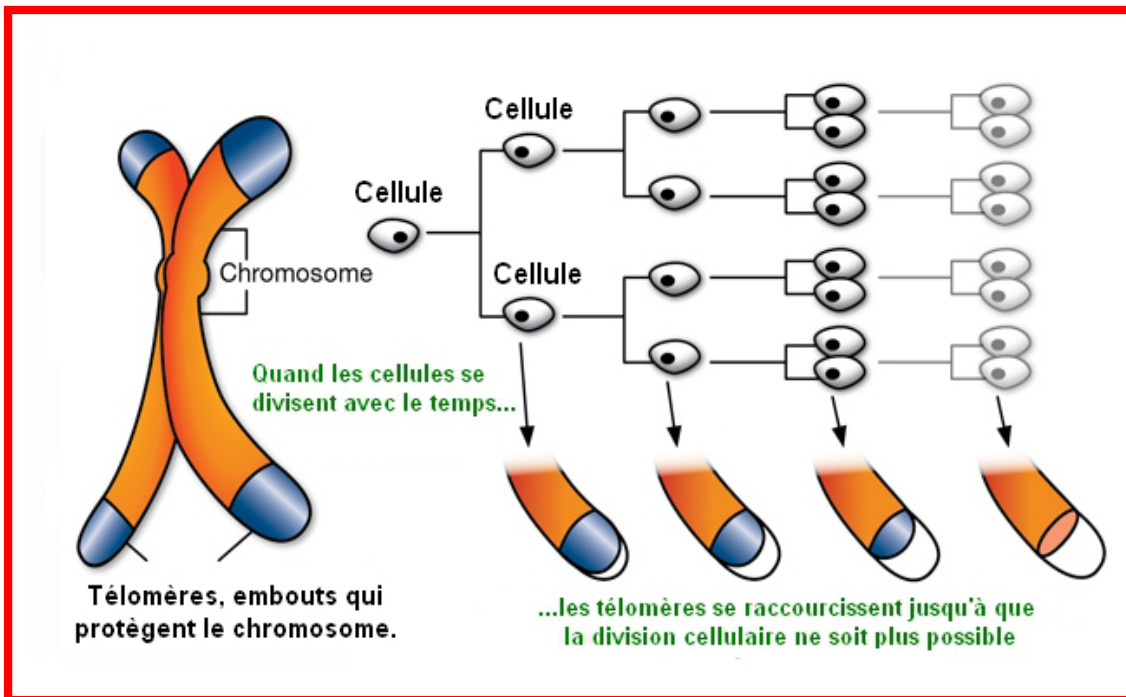


Figure 7 : La perte des téломères lors du vieillissement cutané intrinsèque (Buckingham et Klingelutz, 2011).

II.1.2- Variations hormonales

Au cours du vieillissement, la sécrétion de nombreuses hormones est modifiée et ce changement de contexte hormonal peut influencer sur le reste de l'organisme. La peau est un organe hormono-dépendant sensible aux stéroïdes sexuels. L'impact des hormones stéroïdiennes sur le tissu cutané semble être au centre du processus du vieillissement cutané (Singh, 2009; Wilkinson et Hardman, 2017). La production des oestrogènes est principalement assurée par les cellules endocrines des ovaires lors de chaque cycle menstruel avant la ménopause, mais d'autres tissus peuvent en synthétiser en petites quantités comme la peau (les adipocytes de l'hypoderme), le foie, les glandes surrénales, le cerveau, les seins et les testicules. Les kératinocytes, les fibroblastes, les follicules pileux, les glandes sébacées et les cellules endothéliales des vaisseaux cutanés possèdent des récepteurs aux oestrogènes. Une fois que ces hormones se fixent aux récepteurs cellulaires, elles activent l'expression de gènes modulant le renouvellement des cellules cutanées. Avec l'âge, on observe un déclin du niveau d'hormones sexuelles parmi lesquels l'oestrogène. Les cellules cutanées vont donc se renouveler plus lentement, avec pour conséquence un amincissement des couches dermiques et épidermiques. La circulation sanguine diminue également ainsi que la faculté de la peau à

maintenir son élasticité (**Thornton, 2013**). Il a été montré que les femmes ménopausées avaient un niveau de collagène I et III qui diminuait ainsi que le ratio collagène III/collagène I en comparaison des femmes pré-ménopausées. La capacité de la peau à retenir l'eau, grâce notamment, aux lipides de la couche cornée, diminue avec le déclin d'oestrogène

II.1.3. Le stress oxydant et radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques indépendantes (atomes, molécules ou leurs fragments) possédant un ou plusieurs électrons célibataires capables d'interagir avec différents composés de l'organisme. Dans les cellules, on en distingue trois groupes (**Gašperlin et Gosenca, 2011; Poljsak et al., 2013**) : Les radicaux primaires qui constituent un ensemble restreint de composés radicalaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion super oxyde $O_2^{\circ-}$ et le radical hydroxyle HO° ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO° . Les radicaux secondaires qui se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule et, enfin d'autres espèces dérivées de l'oxygène, dites espèces actives de l'oxygène comme l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH). Ces dernières ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de certains radicaux. Les radicaux libres et leurs précurseurs sont souvent appelés espèces oxygénées réactives (EOR) ou espèces nitrées réactives (ENR).

Les radicaux libres dérivent des processus métaboliques normaux de l'organisme comme la phagocytose, la respiration mitochondriale, la synthèse des prostaglandines ou de certains facteurs externes (rayons UV, consommation de l'alcool et du tabac) à l'organisme. Quelques facteurs physiologiques comme le stress et certaines maladies peuvent aussi être responsables de la production des radicaux libres (**Gašperlin et Gosenca, 2011; Shah et Sinha, 2013**).

En l'absence d'un système antioxydant suffisamment efficace, une surproduction des radicaux libres est capable de provoquer des lésions directes des molécules biologiques et l'augmentation dans les fibroblastes du niveau des ARN messager codant l'élastase, et des MMPs, enzymes dégradant les fibres d'élastine et collagènes respectivement (**Awala et Oyetayo, 2016**). Il existe dans les couches épidermiques et dermiques de nombreuses cibles potentielles (lipides, protéines, glucides et ADN) dont la dégradation due au stress oxydant

conduit à l'altération de l'élasticité du tissu cutané, à l'inflammation et au vieillissement précoce (Figure 8).

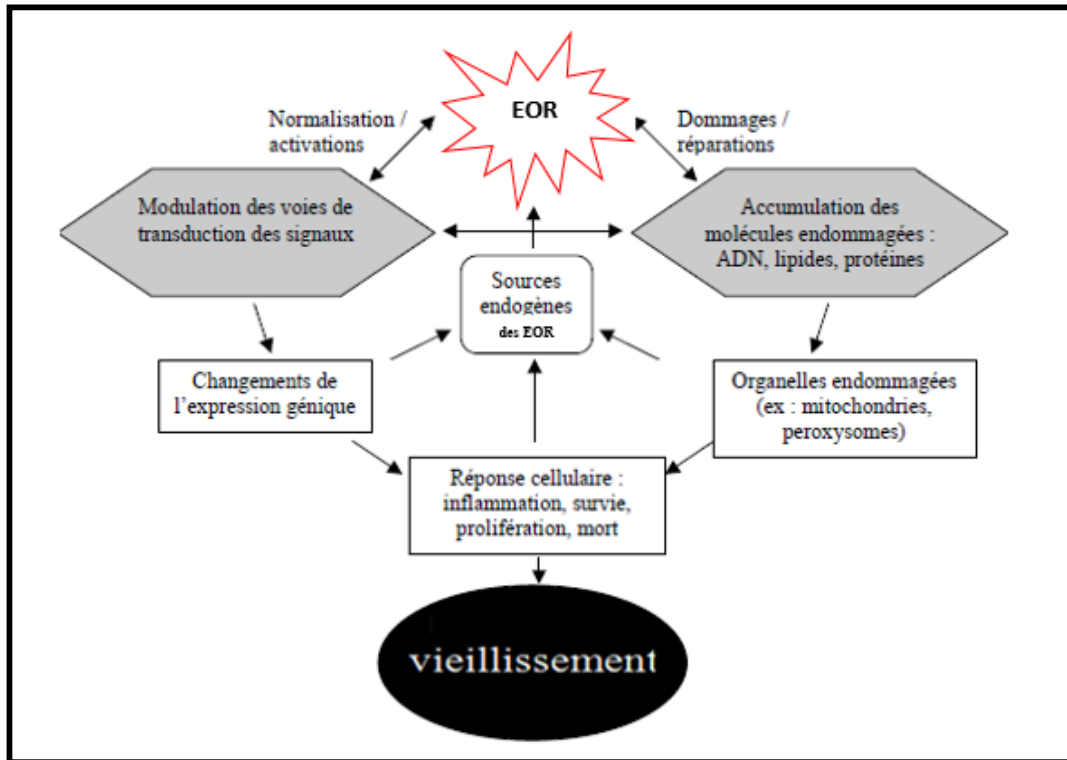


Figure 8 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les EOR et les stress oxydatifs contribuent au processus du vieillissement (Awala et Oyetayo, 2016)

EOR : Espèces oxygénées réactives

II.1.4- Facteurs enzymatiques

Au cours du vieillissement chronologique apparaît un déséquilibre entre trois paramètres intervenant dans le dynamisme et le métabolisme cutanés : la synthèse de macromolécules de la matrice extracellulaire, les protéinases susceptibles de dégrader ces composés matriciels et les inhibiteurs spécifiques de ces enzymes. On assiste à l'activation du complexe *activator protein-1* (AP-1) composé des protéines c-Jun et c-Fos. Il s'agit d'un facteur de transcription qui contrôle à la fois l'expression des gènes codant pour les MMPs et ceux de la synthèse des procollagènes 1 et 3. La synthèse des collagènes 1 et 3 tend alors à diminuer, le blocage du *transforming growth factor beta* (TGF- β) diminue aussi la synthèse du collagène alors qu'augmente la production de MMP-1 (collagénases), MMP-3 (stromelysine-1) et MMP-9 (gélatinases) qui dégradent les fibres élastiques et les faisceaux de collagène du derme tandis que l'expression des inhibiteurs des métallo-protéinases matricielles (TIMPs) diminue au cours de la sénescence des fibroblastes. Ce déséquilibre

entre MMPs et inhibiteurs entraîne l'excès de dégradation de la matrice extracellulaire caractéristique du vieillissement cutané. Ces mécanismes sont accélérés par les espèces oxygénés réactives (EOR) (**Freitas-Rodríguez *et al.*, 2017; Philips *et al.*, 2011**).

II.1.5- Théorie de la glycation non enzymatique

La peau est un organe en renouvellement permanent. Tout comme les os, les cellules de la peau meurent et se renouvellent chaque jour. Avec l'âge, le taux de renouvellement devient plus faible et des protéines modifiées sont produites en plus grande quantité sans être entièrement éliminées. Au stade moléculaire, on s'aperçoit que les molécules séjournent plus longtemps dans les cellules vieillissantes et leurs structures et activité s'altèrent peu à peu à cause notamment de modifications post-traductionnelles (**Yagi et Yonei, 2018**).

Parmi celles-ci, on cite la glycation non enzymatique qui est une réaction qui consiste à une interaction entre le groupement carbonyle d'un sucre, d'un aldéhyde ou d'une cétone et le groupement amine libre d'une protéine. Cette réaction conduit à la formation d'une base de Shift qui peut subir des réarrangements intramoléculaires (réarrangements d'Amadori) pour former des composés dicarbonylés. Ce réarrangement est suivi d'une réaction plus complexe appelée réaction de Maillard (déshydratation et/ou condensation des composés) qui aboutit à la formation de manière irréversible aux produits terminaux de la glycation avancée (PTGA) plus connus sous le terme de produits de Maillard (**Babizhayev *et al.*, 2012; Ichihashi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017**). Ces produits de Maillard s'attaquent aux protéines de la matrice extracellulaire (collagène et élastine) dont la durée de vie dans l'organisme est très longue, modifient leurs propriétés ce qui les rendent plus résistantes à la protéolyse et empêchent leurs renouvellements ; ils induisent aussi la formation de pontages moléculaires entre les fibres de collagène, les rendant plus rigides et moins solubles. Ces effets se traduisent par une perte d'élasticité et de tonicité du derme qui induit l'apparition de rides. Enfin, les PTGA pourraient avoir d'autres actions en se liant à des récepteurs spécifiques présents sur les macrophages ce qui entraîne les inflammations (**Yagi et Yonei, 2018**).

II.2- Vieillessement cutané extrinsèque

Parallèlement au vieillissement intrinsèque qui touche chacun d'entre nous quelque soit notre mode de vie, cohabite le vieillissement extrinsèque. Il est lié à notre mode de vie et aux facteurs environnementaux (tabac, alcool, rayons UV). Il est le plus préoccupant de nos jours parce qu'il cause d'énormes dégâts sur la peau, accentue et accélère le processus de

vieillesse génétique. L'exposition à ces agressions peut être plus ou moins maîtrisée par l'Homme. Parmi les facteurs provoquant le vieillissement extrinsèque, les radiations UV provenant des rayonnements solaires sont responsables de plus de 80% des dégâts cutané. **(Babizhayev et al., 2012; Bosch et al., 2015; Gašperlin and Gosenca, 2011).**

II.2.1- Le rayonnement solaire

Le soleil a indéniablement des effets bénéfiques sur l'organisme. On peut citer ses bienfaits thérapeutiques dans la dermatite atopique, le psoriasis ou encore l'ictère néonatal mais aussi antirachitique car il permet la synthèse finale de la vitamine D3. En revanche, le soleil émet des radiations électromagnétiques représentées par un spectre continu qui s'étend des rayons cosmiques aux ondes radios. Filtrés par l'atmosphère, deux tiers de ces rayonnements parviennent jusqu'à la terre et induisent l'héliodermie c'est-à-dire le vieillissement actinique ou photo vieillissement. Les rayons cosmiques, gamma, X et UVC n'atteignent pas la surface de la terre (figure 9). Les longueurs d'ondes les plus courtes étant les plus énergétiques, les rayons UV constituent la portion du spectre solaire la plus active biologiquement. La profondeur de pénétration de ces rayonnements dans la peau va dépendre de leur longueur d'onde et de leurs interactions avec les cellules cutanées **(Amaro-Ortiz et al., 2014; D'Orazio et al., 2013; Holick, 2016)**. Les rayons UV sont communément décomposés en 3 segments: les UVC ayant les longueurs d'ondes les plus courtes (200-290 nm), les UVB (290-320 nm) et les UVA ayant les longueurs d'ondes les plus longues (320-400 nm) **(Amaro-Ortiz et al., 2014; D'Orazio et al., 2013)**.

Les UVC sont les rayonnements les plus énergétiques et donc les plus nocifs. Absorbés en totalité par la couche d'ozone, ils n'atteignent pas la surface de la terre. Hautement mutagènes, ils servent à détruire les germes et à stériliser les blocs opératoires ; les UVB sont stoppés à 95% par la couche d'ozone. Les rayons atteignant la terre, pénètrent jusqu'à 160-180 µm dans l'épiderme et le derme papillaire. Les UVB sont principalement absorbés par la couche cornée, 10% seulement atteignent le derme. Les UVA dont 90 à 95% des rayons atteignent la surface de la terre, pénètrent profondément dans l'épiderme et le derme : jusqu'à 1000 µm à l'intérieur de la peau. Les UVA traversent l'épiderme et sont absorbés par la mélanine, 20 à 30% atteignent toutefois le derme **(Amaro-Ortiz et al., 2014; D'Orazio et al., 2013)**.

La lumière infrarouge (IR) est dotée de la plus faible énergie. Cependant, elle compte pour environ 50% du rayonnement solaire atteignant notre peau.

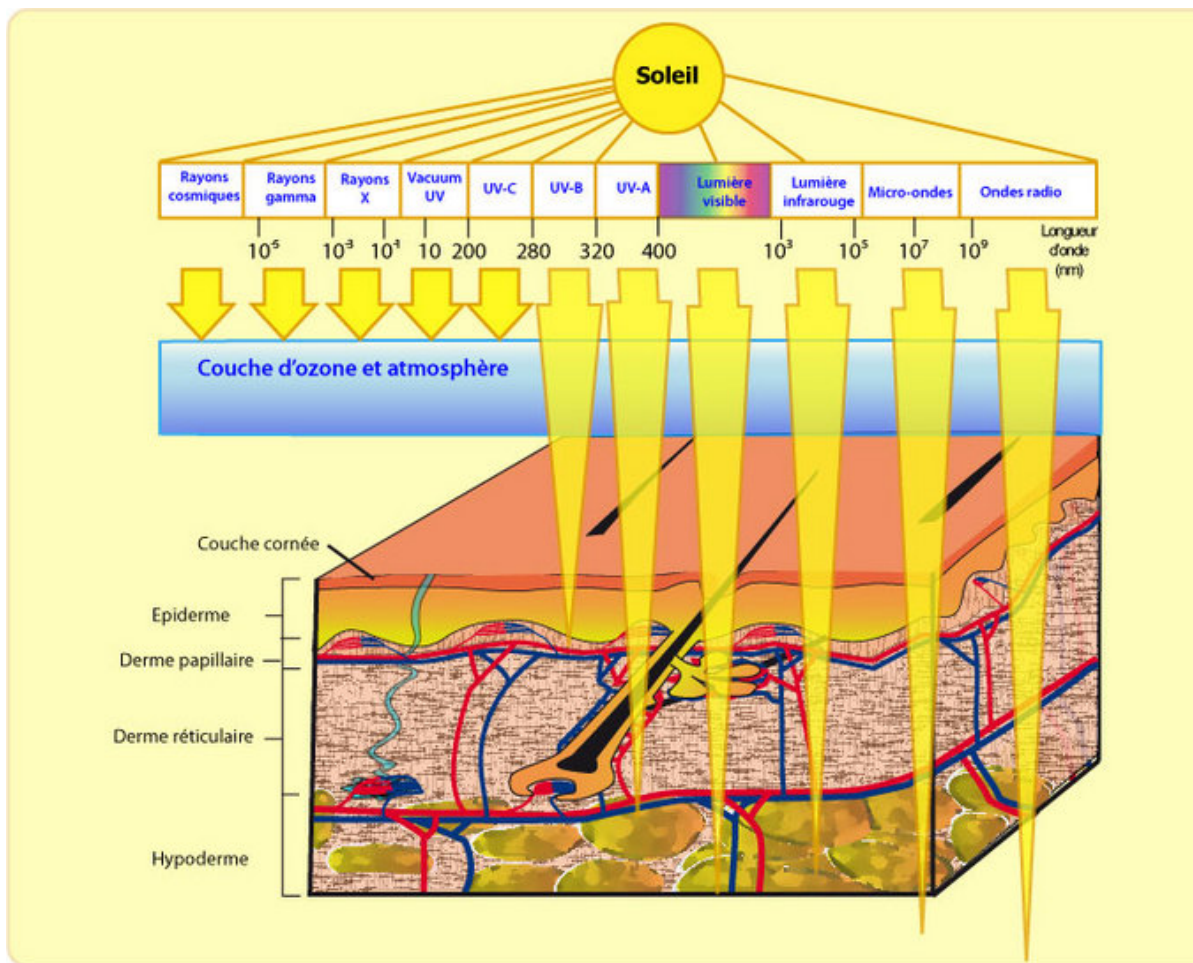


Figure 9 : Pénétration des radiations solaires dans la peau (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014; D’Orazio *et al.*, 2013).

Malgré le fait que 10% seulement des rayons UVB atteignent la peau, leurs effets sont plus nocifs et ils sont largement responsables du photo-vieillessement (**Bravo *et al.*, 2017; Holick, 2016**).

II.2.1.1- Mécanismes du photo-vieillessement

Le rayonnement ultraviolet, par des phénomènes de photosensibilisation endogène, entraîne des modifications dans toutes les cellules cutanées. Son mécanisme d’action est double: soit par interaction directe sur les composantes cellulaires, soit de façon indirecte par le biais des formes actives de l’oxygène et les mécanismes impliqués qui diffèrent d’une cellule à l’autre (**Bosch *et al.*, 2015**).

a-) Mécanismes au niveau des fibroblastes

Le rayonnement ultraviolet entraîne une production excessive des espèces oxygénées réactives (EOR) au niveau de la matrice extracellulaire du derme et dans les fibroblastes.

Cette production excessive dépasse les capacités des systèmes de défense antioxydant endogène en plus, les rayons UV inhibent les antioxydants enzymatiques (catalase et GPx) et non enzymatiques (vitamine E, ubiquinone et GSH) et affectent par conséquent les mécanismes de défense contre les EOR dans la peau conduisant à un stress oxydant intense.

La production d'EOR dans les fibroblastes est détectable à des doses très faibles. Les UV stimulent majoritairement la production d'O₂^{•-} par la NADPH oxydase et par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils induisent la NO synthase qui produit de façon constitutive le NO. Le NO agit soit sous sa forme radicalaire (NO•), soit par l'intermédiaire de l'ion nitronium (NO₂⁺) ou du peroxy-nitrite (ONOO⁻).

Les EOR, produits en excès, induisent des lésions oxydatives graves : ils oxydent plus particulièrement les phospholipides des membranes, les acides nucléiques, les sucres, les protéines cellulaires et extracellulaires et produisent, de façon indirecte, des modifications d'activité enzymatique et de la régulation de la transcription (Figure 10). Si les lésions sont trop importantes et que les systèmes de réparation ou de détoxification ne sont pas assez efficaces, les cellules subissent l'apoptose ou la nécrose (**Deng *et al.*, 2018; Gęgotek *et al.*, 2017**).

Egalement, les UV inhibent l'enzyme tyrosine-phosphatase menant à l'activation de récepteurs membranaires de cytokines et de facteurs de croissance et donc au signallement intracellulaire. Cela va stimuler l'expression et l'activation du facteur de transcription AP-1. Les rayons UV peuvent également activer directement la protéine c-Jun, et induire une diminution des récepteurs nucléaires aux rétinoïdes et donc de l'acide rétinoïque (RA) qui agit de façon antagoniste sur le facteur de transcription AP-1. Ainsi, l'activation de l'AP-1, plus marquée que dans le vieillissement lié à l'âge, favorise à la fois une baisse de la synthèse du collagène de type 1 et l'hyperexpression de plusieurs métalloprotéinases matricielles (MMP): MMP-1, MMP-3, MMP-9 impliquées dans la dégradation des fibres collagènes et élastiques (Figure 11) (**Chaiprasongsuk *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2016**).

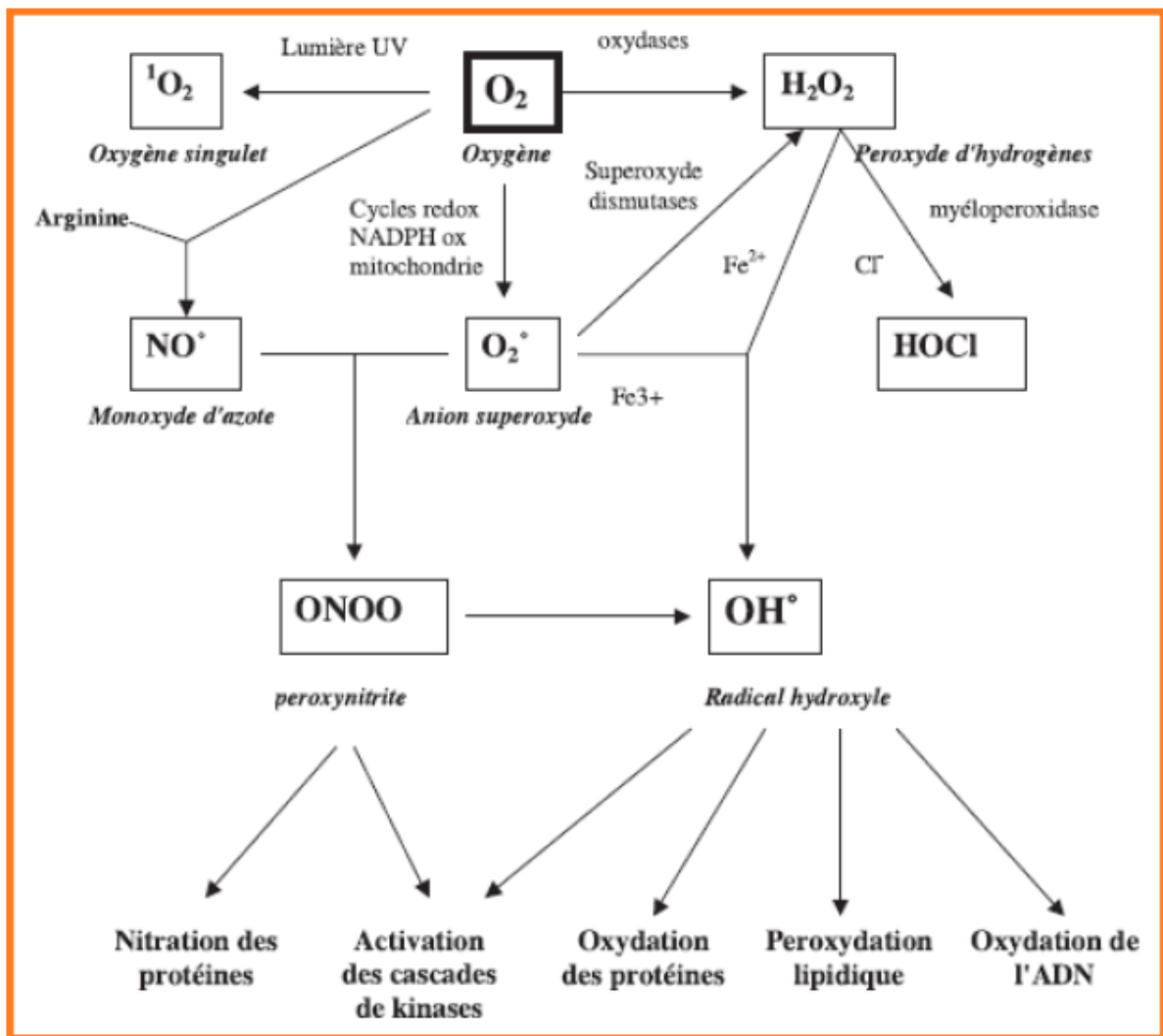


Figure 10 : Production des espèces réactives de l’oxygène par l’action des rayons UV et les lésions cellulaires induites au niveau des fibroblastes (Gęgotek *et al.*, 2017)

Les MMP infiltrent précocement la peau dans le photo vieillissement, conduisant surtout à une destruction du collagène, mais aussi de l’élastine, des protéoglycanes et de la laminine. L’équilibre normal entre les MMP et leurs inhibiteurs est ainsi déplacé vers l’augmentation des MMP (Pittayapruek *et al.*, 2016). Aussi, les rayons UV activent le facteur de transcription NF-kB qui diminue l’activité des récepteurs TGF-β et influence par la suite la production de cytokine inflammatoire et la formation du collagène (Figure 11). Le programme génétique des fibroblastes est ainsi perturbé, induisant une augmentation de l’expression du gène de l’élastine et la production abondante d’élastine anormale responsable de l’élastose actinique. La sensibilité des fibroblastes aux signaux de transduction des facteurs de croissance tels que le TGF-β est diminuée ainsi que leur capacité à se diviser (Kwon *et al.*, 2019; Yamaba *et al.*, 2016).

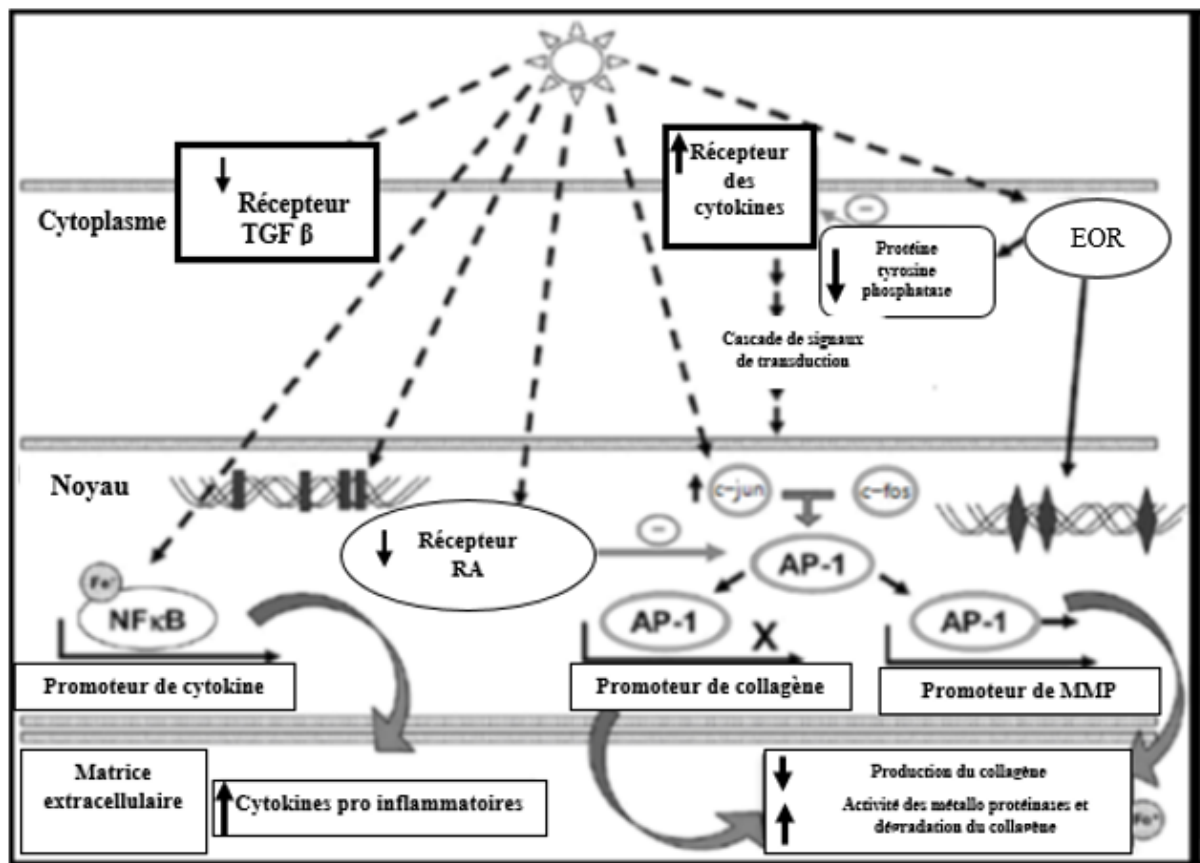


Figure 11 : Effets des UV sur les fibroblastes (Chaiprasongsuk *et al.*, 2017)

TGFβ : Transforming Growth factor β ; *AP-1* : Activator Protein 1 ; *EOR* : Espèces Oxygénées reactives ; *RA* : Retinoic acid ; *NF-KB* : Nuclear factor K B.

b-) Mécanismes au niveau des mélanocytes

Au niveau des mélanocytes, l'énergie lumineuse des UV est directement absorbée par l'ADN ce qui induit principalement des modifications des bases pyrimidiques et également l'ornithine décarboxylase (enzyme stimulant la synthèse de polyamines). Ceci favorise l'activité de la NO synthétase qui induit l'érythème, stimule la mélanogénèse et contribue à l'immunosuppression. La stimulation de la mélanogénèse se produit via l'augmentation de l'expression des récepteurs à l'hormone stimulant la pigmentation (MSH), dont les cibles naturelles sont situées sur la membrane des mélanocytes. Elle intervient dans la croissance, le maintien de la différenciation, mais surtout dans la synthèse de la mélanine. La stimulation de la MSH oriente la production de la mélanine dans le sens de l'eumélanine par activation du facteur de transcription *microphthalmia-associated transcription factor* (Mitf) qui regule les gènes codant pour les enzymes intervenant dans la synthèse de la mélanine. Mitf est capable

de se lier au niveau des promoteurs pour activer la transcription des gènes tyrosinase (TYR), *tyrosinase related protein-1*(TRP1) et dopachrome tautomérase (DCT). Une augmentation de l'expression des enzymes tyrosinase, *tyrosinase related protein-1* et la dopachrome tautomérase (DCT) par action directe des photons UV s'accompagne d'une augmentation du nombre des mélanocytes, favorisant le transfert d'un nombre croissant de mélanosomes vers les kératinocytes. Leur fonction de mélanisation semble perturbée (figure 12). On observe de nombreux désordres de la pigmentation avec des hypo ou hyperpigmentations de la peau (mélanoses, tâches de vieillesse, dermatite atopique, kératose séborrhéique, fibrodermatose et vitiligo) (Ben-Yehuda Greenwald *et al.*, 2016; D'Mello *et al.*, 2016; Videira *et al.*, 2013).

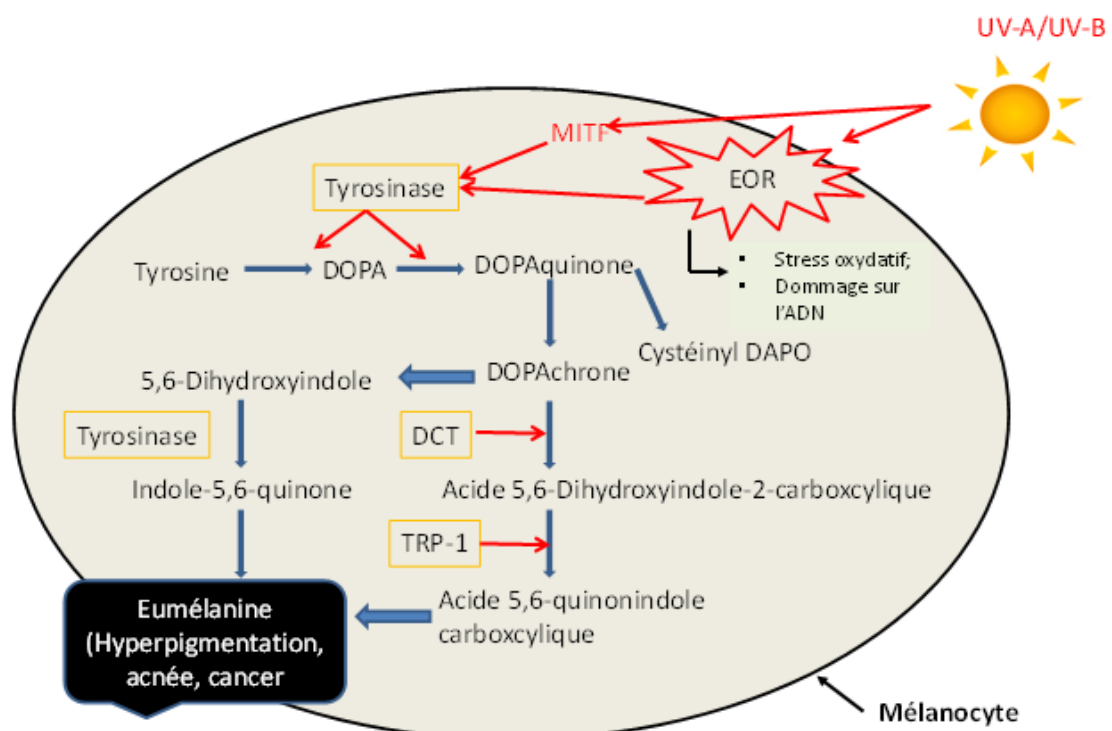


Figure 12 : Mécanismes d'induction de la mélanogénèse par les rayons ultra-violettes (Ben-Yehuda Greenwald *et al.*, 2016; D'Mello *et al.*, 2016).

EOR : Espèces Oxygénées réactives ; DCT : Dopachrome Tautomérase ; *TRP-1* : *Tyrosinase Related Protein-1*; *MITF*; *microphthalmia-associated transcription factor*

c-) Mécanismes au niveau des cellules Inflammatoires et immunosuppression locales

Les rayons UV induisent à la fois des dommages directs de l'ADN, une inflammation et immunosuppression locales. Les dommages de l'ADN causés par l'absorption des UV provoquent la modulation des gènes codant pour des molécules impliquées dans la

présentation de l'antigène et l'activation des enzymes de réparation de l'ADN. De plus, les rayons UV initient, via l'activation d'AP-1 et de NF-Kappa B, la production de cytokines inflammatoires et d'immunosuppresseurs : les IL-1, -6, -8 et -10 et le TNF- α . Le TNF- α induit par le facteur NF-Kappa B, joue notamment un rôle important dans la réponse immunitaire cutanée en stimulant la phase de réaction aiguë de l'inflammation (**Kuo et al., 2017; Lee et al., 2017**).

L'action directe des photons UV sur les membranes plasmiques des cellules cutanées entraîne l'activation de la phospholipase A2 avec relargage d'acide arachidonique et clivage du diacylglycérol. Cette action aboutit par la suite à l'induction des prostaglandines et des enzymes (cyclo-oxygénase-2 et les lipoxygénases), enzymes qui métabolisent l'acide arachidonique en des produits qui favorisent le recrutement des cellules de l'inflammation (macrophages et cellules de langherans). Ces cellules ainsi recrutées produisent un grand nombre des médiateurs inflammatoires parmi lesquels l'oxyde nitrique (NO).

Les cyclooxygénases sont impliquées dans la synthèse des protanoïdes. L'action des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) aboutit à la formation de prostaglandines (PG) de type G2 (PGG2) instable qui est rapidement modifiée pour former la PGH2 précurseur des prostaglandines D2, E2 et F2a, des protacyclines PGI2 et 6 kéto-PGF1a et du thromboxane (TX) A2 et TXB2. Parmi les protanoïdes synthétisés, la PGE2 est majoritairement produite par les macrophages et joue un rôle important dans les processus inflammatoires (**Lin et al., 2017; Na and Ryu, 2018**).

Les lipoxygénases quant à elles incorporent une molécule d'oxygène dans les acides gras insaturés comme l'acide arachidonique et l'acide linoléique et produisent, à partir de l'acide arachidonique, de l'acide hydroxyperoxyeicosatétraénoïque (HPETE) qui est transformé en acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) et également de l'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque (13(S)-HODE) à partir de l'acide linoléique et des des leucotriènes (LT) A4. Ces molécules jouent un rôle pro-inflammatoire *via* une augmentation de l'expression et de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et CCL2. Il existe trois types de lipoxygénase en fonction de la position du carbone où sera incorporé l'oxygène : la 5-lipoxygénase, la 12-lipoxygénase et la 15-lipoxygénase.

Par ailleurs, les EOR induites par les UV oxydent la membrane lipidique des cellules de la peau induisant la libération d'acide arachidonique, renforçant ainsi le processus (figure13). Il est à noter également que l'acide trans-urocanique photorécepteur présent dans

la couche cornée joue le rôle de capteur de molécules d'eau rendant la surface de la peau plus souple et absorbe les rayons UV, ce qui provoque son isomérisation et la production d'acide cis-urocanique, un acide immunosuppresseur (Lin *et al.*, 2017; Na and Ryu, 2018).

La fonction immunitaire cutanée s'affaiblit avec l'âge et amplifie l'inflammation. On dénombre en moyenne 1200 cellules de Langerhans par mm² de peau chez les jeunes contre 800 chez les personnes âgées.

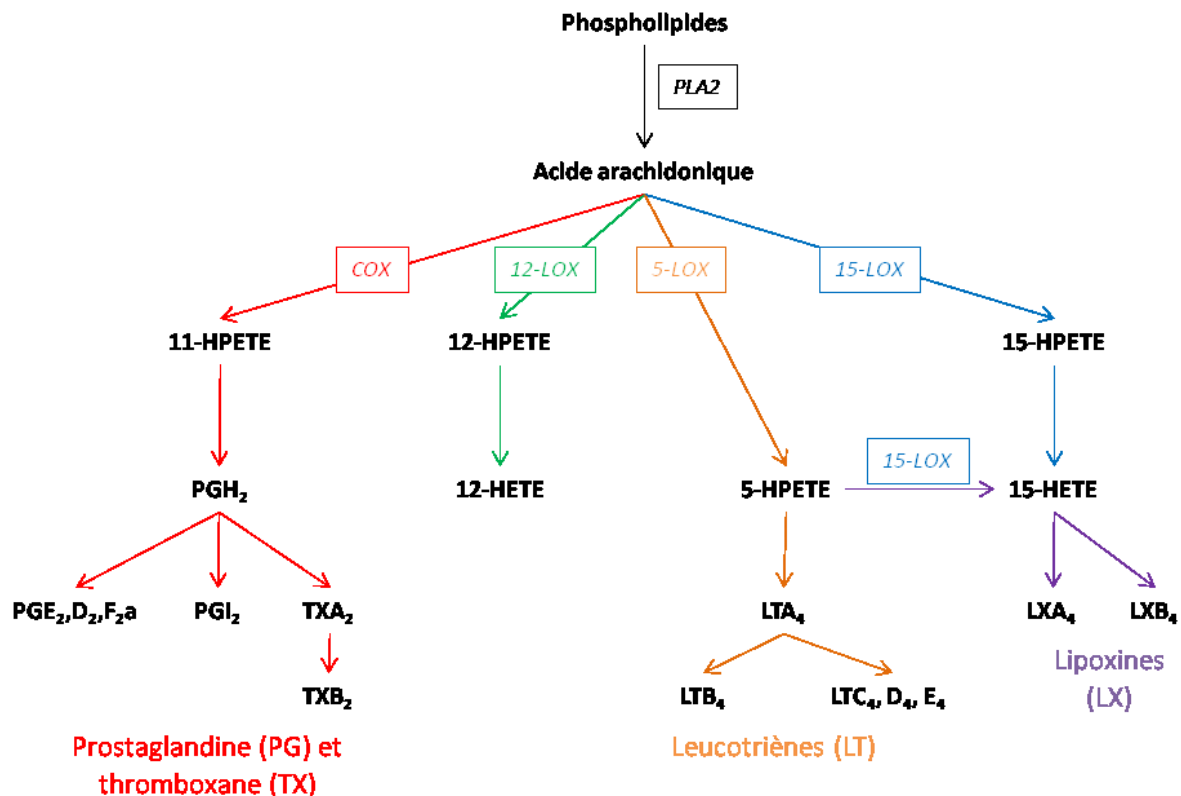


Figure 13 : Les principales voies métaboliques de l'acide arachidonique(Lin *et al.*, 2017; Na and Ryu, 2018).

PLA2 : Phospholipase A2; COX : Cyclooxygénase; LOX : Lipoxygénase; HPETE : Hydroxyperoxyeicosatétraénoïque; HETE : Hydroxyeicosatétraénoïque; PG : Prostaglandine ; PGI₂ : Protacyclines.

II.2.2- Autres facteurs

La consommation de tabac et d'alcool provoquent une augmentation des MMPs 1 et 3, provoquant ainsi la dégradation de collagène et une perte de l'équilibre entre la biosynthèse et la dégradation du tissu conjonctif dermique. Les EOR sont également impliquées dans le vieillissement prématuré lié au tabac. Une diminution de la biosynthèse des collagènes I et III est également observée ainsi qu'une accumulation de protéoglycannes altérés. Une

augmentation de l'ARNm de la tropoélastine induisant une accumulation de matériel élastique anormale, appelée élastose, est également observée. Des extraits de tabac induisent l'augmentation de la forme latente du TGF dans les surnageant de fibroblastes dermiques cultivés *in vitro*. L'accumulation de cette forme non fonctionnelle, ainsi que la régulation négative de son récepteur spécifique, conduisent à la diminution de synthèse des protéines de la matrice extracellulaire (Morita, 2016; Okada *et al.*, 2013).

Comme dit précédemment, la peau est une barrière en contact direct avec les polluants de l'air, ce qui accélère le vieillissement cutané. Des études ont montré que l'ozone était capable d'induire l'expression de MMP-9 au niveau des peaux de souris, suggérant ainsi un rôle dans le remodelage matriciel. Une étude épidémiologique récente a montré un lien direct entre les poussières en suspension dans l'air et l'accélération des principaux signes de vieillissement de la peau tels que les rides et l'apparition de taches cutanées. Ce mécanisme semble être médié par la production de ROS. De plus, ces particules sont capables de servir de transporteurs pour les composés chimiques et les métaux se localisant au niveau de la mitochondrie menant au vieillissement cutané via les dommages (Drakaki *et al.*, 2014).

II.2.3- Mécanisme général d'induction du vieillissement cutané extrinsèque

Les facteurs environnementaux particulièrement les rayons ultraviolet B induisent le stress oxydatif au niveau des cellules épidermique et dermique ce qui provoquent l'activation et l'induction de certaines enzymes tels que l'élastase; les métalloproteinases et les enzymes de la famille de tyrosinase (TYR; TRP-1 et TRP-2) (Farage *et al.*, 2010) entraînant l'hyperpigmentation, les acnés et le cancer; la dégradation de l'élastine et du collagène, la perte de l'élasticité de la souplesse et l'apparition des rides (Koo *et al.*, 2008; Wiegand *et al.*, 2017). Les facteurs environnementaux par le biais de EOR détruisent également les cellules inflammatoires et activent les enzymes (cyclo-oxygénase-2, les lipoxygénases, phospholipase A2 etc..) qui métabolisent l'acide arachidonique entraînant des inflammations (Gašperlin and Gosenca, 2011; Lin *et al.*, 2017; Na and Ryu, 2018). La figure 14 suivante résume les voies d'induction du vieillissement cutané prématuré par les facteurs environnementaux.

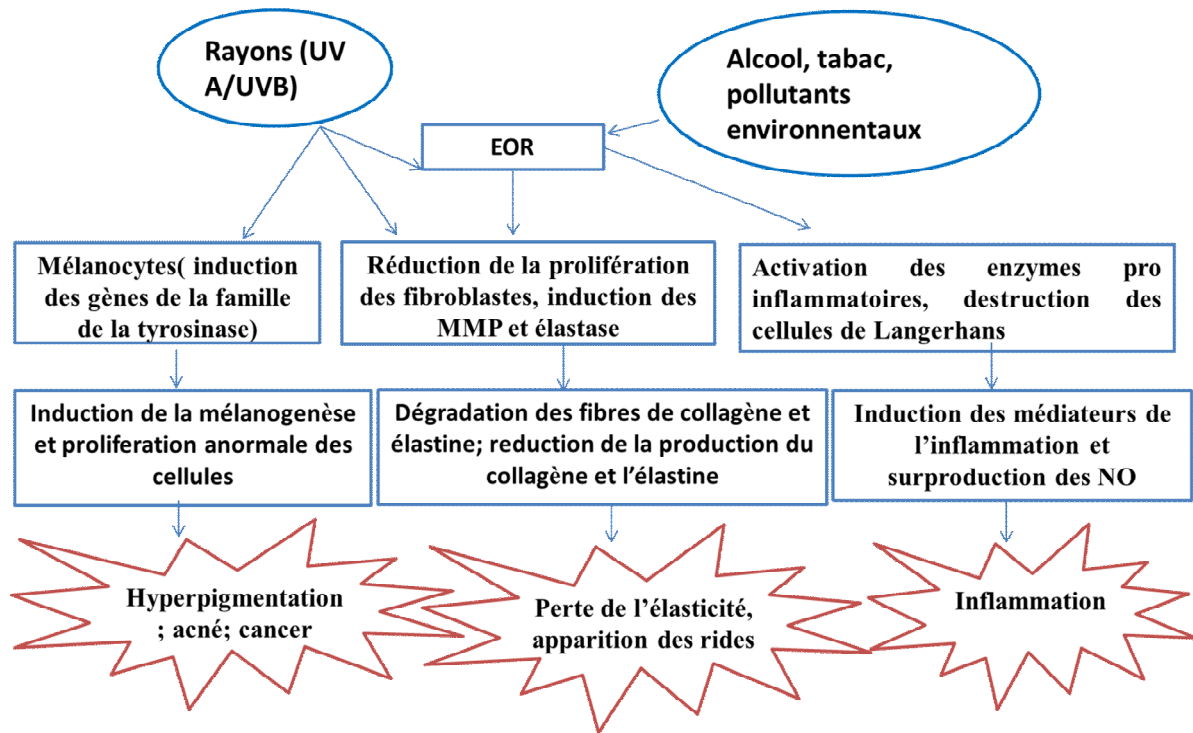


Figure 14 : Voies d'induction du vieillissement cutané prématuré (Mukherjee *et al.*, 2011; Swalwell *et al.*, 2012)

III. Vieillesse intrinsèque/extrinsèque

Le vieillissement chronologique de la peau peut donc se concevoir comme l'atrophie structurale irréversible et le déclin fonctionnel de la peau en fonction de l'âge. La photo-exposition joue un rôle considérable dans le processus de vieillissement cutané. Couplée avec le vieillissement chronique, l'exposition aux rayons UVs accélère surtout le processus du vieillissement cutané. Les vieillissements intrinsèque et extrinsèque additionnent leurs effets délétères sur toutes les structures cutanées. Les différentes modifications génétiques sont résumées dans le tableau II précédent. Le tableau I ci-après récapitule les effets généraux du vieillissement intrinsèque et photo- vieillissement sur les composantes cutanées (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014; Holick, 2016).

Tableau I : Effets généraux du vieillissement intrinsèque et photo- vieillissement sur les composantes cutanées (Amaro-Ortiz *et al.*,

2014; Holick, 2016)

Structures cutanées	Vieillissement intrinsèque		Photo-vieillissement	
	Modifications histologiques	Répercussions cliniques et fonctionnelles	Modifications histologiques	Répercussions cliniques et fonctionnelles
Stratum corneum	<ul style="list-style-type: none"> • Epaisseur inchangée • Diminution de l'adhésion des cornéocytes ; • Diminution de l'hydratation de la couche cornée. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sècheresse et rugosité de la peau. 	<ul style="list-style-type: none"> • Epaisseur augmentée ; • Couche superficielle déshydratée ; • Les cellules forment par endroit des amas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Peau rugueuse, écaillée avec formation des microfissures.
Reste de l'épiderme	<ul style="list-style-type: none"> • Epaisseur diminuée ; • Taux de renouvellement cellulaire ralenti ; • Cellules épidermiques moins régulièrement alignées avec forme, taille et propriétés de coloration également irrégulières ; • Membrane basale aplatie. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cicatrisation ralentie ; • Tendance au décollement cutané traumatique et à la formation des bulles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Epaisseur irrégulière parfois atrophique, parfois hyperplasique ; • Aspect diplasique des cellules basales par endroit ; • Hyperkératose infundibulaire des canaux sébacés avec rétention sébacée. 	<ul style="list-style-type: none"> • Displasie, néoplasie épithéliale ; • Formation des grains de milium, et de comédons.
Cellules de Langerhans	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre nettement diminué. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'immunité à médiation cellulaire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre nettement diminué. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'immunité à médiation cellulaire.
Mélanocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre fonctionnel diminué. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la capacité de bronzer ; • Diminution de l'absorption de la lumière UV augmentant le risque carcinogène. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mélanocytes hyperplasiques et à nombre diminué ; • Irrégularité des transferts de la mélanine dans l'épiderme. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lentigo actinique ; • Irrégularité de la pigmentation.

Tableau I (suite) : Effets généraux du vieillissement intrinsèque et photo- vieillissement sur les composantes cutanées (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014; Holick, 2016)

Structures cutanées	Vieillissement intrinsèque		Photo- vieillissement	
	Modifications histologiques	Répercussions cliniques et fonctionnelles	Modifications histologiques	Répercussions cliniques et fonctionnelles
Matrice dermique	<ul style="list-style-type: none"> • Epaisseur du derme diminuée ; • Fibres collagène moins nombreuses mais plus épaisses et désorganisées ; • Structure et propriétés du tissu élastique du derme réticulaire altérées ; • Diminution des fibres élastiques du derme papillaire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de la laxité de la peau ; • Rides. 	<ul style="list-style-type: none"> • Remplacement de la matrice normale comprenant du collagène, de l'élastine et des glycosaminoglycanes par de larges boules grossières de fibres élastiques avec diminution du collagène. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rides, puis aspect jaune, pavés et flasques de la peau.
Vascularisation dermique	<ul style="list-style-type: none"> • Epaisseur des vaisseaux réduite ; • Vascularisation du derme papillaire diminuée ; • Diminution de l'épaisseur du tissu cutané et sous-cutané ; • Diminution de la vascularisation ; • Diminution du réseau vasculaire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pâleur cutanée ; • Perte du pouvoir isolant de la peau, risque d'hypothermie ; • Diminution de la clairance des matériaux étrangers. 	<ul style="list-style-type: none"> • Deux types de changement : <ol style="list-style-type: none"> 1. Perte des plexus papillaires avec aplatissement des crêtes papillaires et diminution de la vascularisation au niveau du derme papillaire. 2. Réponse proliférative aux UV avec des vaisseaux dilatés et élargis dans le derme papillaire et le derme moyen. • Fragilisation vasculaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Pâleur cireuse ; • Télangiectasies ; • Tendance aux ecchymoses.

Tableau I (fin) : Effets généraux du vieillissement intrinsèque et photo- vieillissement sur les composantes cutanées (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014; Holick, 2016)

Structures cutanées	Vieillissement intrinsèque		Photo- vieillissement	
	Modifications histologiques	Répercussions cliniques et fonctionnelles	Modifications histologiques	Répercussions cliniques et fonctionnelles
Annexes	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre et activité des glandes éccrines diminués ; • Glandes sébacées hyperplasiques ; • Activité des glandes apocrines diminuée ; • Ongles ternes ou opaques avec une couleur jaune ou grise, moins épais ; • Stries longitudinales fréquentes ; • Blanchiment des poils et cheveux ; • Densité folliculaire des cheveux diminuée ; • Apparition des poils disgracieux. 	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de la capacité à transpirer ; • Diminution de l'odeur corporelle ; • Ongles plus fragiles ; • Temps de repousse d'un ongle traumatisé ou malade augmenté. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypertrophie des glandes sébacées. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperplasies aux ecchymoses.

Tableau II : Quelques gènes régulés dans les fibroblastes et les mélanocytes âgés (Ben-Yehuda Greenwald *et al.*, 2016; Chaiprasongsuk *et al.*, 2017; D’Mello *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016).

Symbole	Nom du gène	Fonction	Numéro de Banque de gènes
Gènes surexprimés			
MMP3	Métalloprotéinases matricielles 3	Dégradation de la matrice extracellulaire	NM_002422
MMP1	Métalloprotéinases matricielles 1	Dégradation de la matrice extracellulaire	NM_002421
IL6	Interleukine 6	Réponse immunitaire	NM_000600
IGFBP5	Protéine 5de liaison aux facteurs de croissance insulinomimétique	Transduction du signal	M65062
ANX1	Annexine 1	Anti-inflammatoire	NM_000700
CTGF	Facteur de croissance tissulaire conjonctif	Prolifération cellulaire	U14750
P21	Inhibiteur -1A de kinase cycline dépendante	Régulation du cycle cellulaire	U03106
TYR	Tyrosinase	Oxydation de la tyrosine, DOPA, DHI et DHICA	MN_606933
TRP-1	<i>Tyrosine Related Protein 1</i>	Stabilisation de l’activité de la tyrosinase	NM_203290
TRP-2	<i>Tyrosine Related Protein 2</i>	Dopachrome tautomérase	MN 191275
Mitf	<i>Mélanocyte Inducine Transcription Factor or microphthalmia-associated transcription factor</i>	Facteur de transcription, régulation des gènes de la pigmentation et prolifération mélanocytaire	NM_193510
Gènes sous-exprimés			
HMOX	Heme oxygénase	Système de défense	NM_002133
APO J	Apolipoprotéine J	Métabolisme des lipides	J02908
SPRRIB	Cornifine	Structure cellulaire	NM003125
MYBL2	b-myb	Régulation du cycle cellulaire	X13293
IGFIR	Récepteur du facteur de croissance 1 ressemblant à l’insuline	Prolifération cellulaire, anti apoptotique	NM_000875
CSFIR	Récepteur du facteur 1 de stimulation des colonies	Prolifération cellulaire	NM_005211
FGF8	Facteur de croissance fibroblastique 8	Prolifération	U36223
CASP3	Caspase	Apoptose	NM_004346

IV- Système de protection et méthodes de prévention du vieillissement cutané

IV.1- Système de protection

IV.1.1- La protection contre le soleil

IV.1.1.1- La barrière cornée

La couche cornée constitue la première barrière, empêchant la pénétration des rayons UV mais aussi des polluants. Les rayons UV sont arrêtés par trois mécanismes : la réflexion des photons du spectre visible et infrarouge par les filaments de kératine, dans les poils et la chevelure, ceux-ci protégeant également la peau du soleil en la recouvrant comme un vêtement ; l'absorption des photons par les lipides de surface constituants du sébum, par l'acide urocanique présent dans la sueur et par les acides aminés de la kératine ; la diffraction des rayons est due à une différence d'indice de réfraction. Comme nous l'avons vu plus haut, l'épiderme est avant tout une barrière assurée par une cohésion très forte entre ses cellules par les jonctions intercellulaires et le ciment intercellulaire.

La peau par sa structure et composition épidermique est donc une barrière efficace vis-à-vis des agents pathogènes extérieurs comme les bactéries ou vis-à-vis des allergènes. De plus, le film hydrolipidique par son acidité freine la prolifération microbienne à la surface de la peau. La flore saprophyte, quant à elle, empêche l'entrée des bactéries grâce à un mécanisme compétitif direct. Plus loin dans l'épiderme, les cellules de Langerhans sont mobilisables et jouent un rôle essentiel en interceptant les petites molécules néfastes qui pénètrent dans la peau. La peau est sans cesse soumise aux agressions mécaniques telles que les chocs, les coupures, les piqûres..., autant de microtraumatismes répétés tout au long de la vie et qui fragilisent notre peau. Les différents étages cutanés jouent un rôle dans la protection mécanique en amortissant et en absorbant les chocs (**Horng *et al.*, 2017**).

IV.1.1.2- La protection mélanique

La barrière de mélanocytes est le dispositif le plus important et le plus efficace dans la photoprotection naturelle. La mélanine est un filtre naturel qui a pour but de protéger l'information génétique des cellules cutanées en empêchant la dégradation de l'ADN par les rayons UV. La mélanine ainsi synthétisée joue un rôle de filtre chimique des rayonnements ultraviolets nocifs, absorbant et réfléchissant plus de 70 % des rayons ayant franchi la barrière cornée. La couleur de la peau ne dépend pas du nombre de mélanocytes mais de la qualité de ceux-ci. La mélanine a un rôle direct de filtre solaire inerte: au contact des radiations solaires,

les mélanosomes supranucléaires protègent l'ADN et absorbent les rayonnements de 200 à 2000 nm, cela se traduit par un dégagement de chaleur (**Ben-Yehuda Greenwald et al., 2016**).

IV.1.1.3- la protection par le film hydrolipidique de surface

Le film hydrolipidique de surface renferme de l'acide urocanique, molécule entrant dans la composition de la sueur. Cet acide a un effet de filtre vis-à-vis des rayons UVB. Plus la sudation est importante, plus cette molécule est concentrée dans la sueur et donc dans le film hydrolipidique, pour une meilleure protection.

Il ne faut pas oublier le rôle de la pilosité qui protège particulièrement le crâne contre les rayonnements intenses. Cette faculté qu'a la peau est très limitée, efficace pour de faibles expositions, pas pour des expositions prolongées ni pour les personnes qui travaillent à l'extérieur. C'est pourquoi il est indispensable d'apporter une photoprotection artificielle (**Na et Ryu, 2018**).

IV.1.2- La protection contre les radicaux libres

IV.1.2.1- Système antioxydant

Un antioxydant est une substance qui, présente à une concentration plus faible que celle du substrat oxydable, réduit ou inhibe l'oxydation de ce dernier (**Kumar and Hemalatha, 2011**). L'organisme dispose des systèmes efficaces de protection qui lui permettent de lutter contre les espèces radicalaires (figure 15). Ces systèmes de défenses sont constitués des molécules, oligoéléments et des enzymes (**Negi et al., 2012**).

Les molécules et oligoéléments sont présents dans les aliments (fruits, légumes) ou dans les plantes médicinales et sont pour la plupart des « piègeurs » de radicaux libres. On distingue : les vitamines C et E, les terpènes (caroténoïdes, huiles essentielles) et les polyphénols. Comme oligoélément, on a : le Sélénium, le Cuivre, le Manganèse et le Zinc.

Quant aux enzymes, on distingue les super oxydes dismutases (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Les SOD catalysent la transformation du radical super oxyde en peroxyde d'hydrogène qui peut être transformé à son tour par la catalase en eau et en oxygène. Cette transformation atténue la formation du radical hydroxyle très réactif. La glutathion peroxydase catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau. Elle réduit aussi le peroxyde lipidique (ROOH) formé par l'oxydation des lipides polyinsaturés en hydroxyle lipidique (ROH) plus stable (**Kumar and Hemalatha, 2011**).

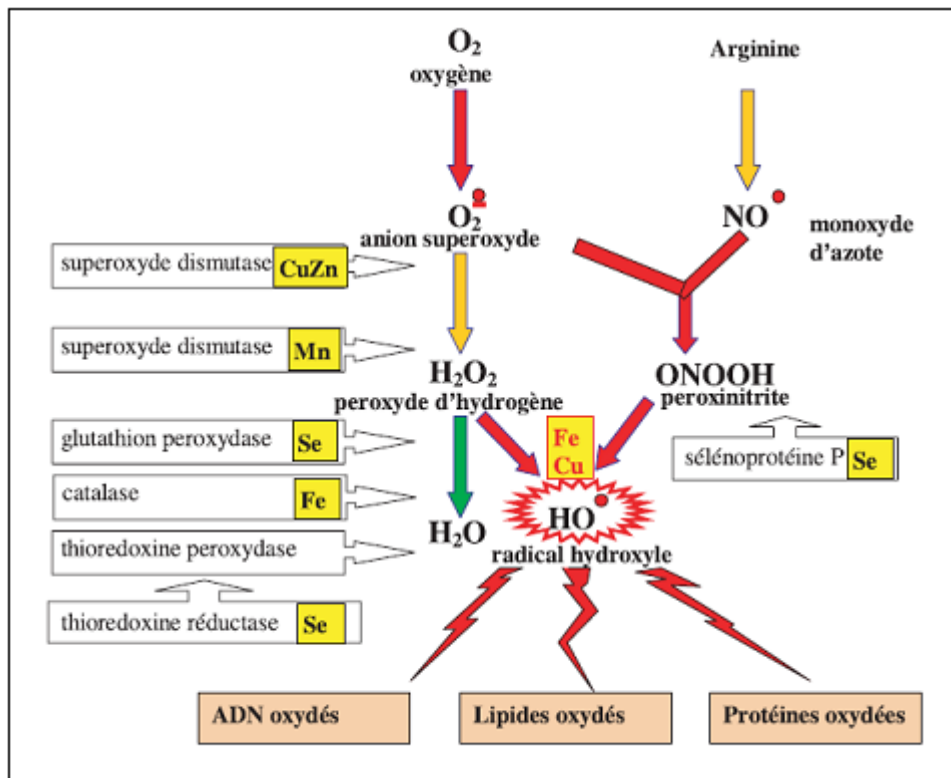


Figure 15 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Negi *et al.*, 2012)

IV.1.2.2- Le piégeage des ions métalliques

Les ions métalliques jouent un rôle dans le développement du stress oxydatif s'ils sont libres dans la cellule. Il suffit de les piéger et de les stocker pour diminuer leur toxicité cellulaire. De ce fait, toutes les molécules capables de piéger les ions métalliques conduisent à une protection. La séquestration des ions métalliques est assurée par des protéines spécifiques de transport telles que la céruléoplasmine pour le cuivre et la transferrine pour le fer. Dans les cellules, la ferritine assure le stockage du fer. Pour le stockage du cuivre ou d'autres métaux lourds, c'est la métallothionine qui assure le stockage. L'hème oxygénase peut être, elle aussi, considérée comme protectrice. De plus, c'est elle qui permet le catabolisme de l'hème en monoxyde de carbone, biliverdine et fer. Une fois formée, la biliverdine se transforme en bilirubine qui possède de puissantes activités antioxydantes (figure 16). Par ailleurs, le fer produit lors de la dégradation provoque l'augmentation de synthèse de la ferritine qui est également impliquée dans la lutte contre les radicaux libres en assurant le piégeage du fer. L'hème oxygénase est indirectement une enzyme antioxydante. Seul l'hème oxygénase 1 (HMOX1) est inductible par divers stimuli (hyperoxie, UV, taux élevé d'hème, peroxyde d'hydrogène, monoxyde d'azote...). Celle-ci est présente dans de nombreux types cellulaires

car elle joue un rôle de cofacteur avec des protéines impliquées dans des fonctions biologiques fondamentales (Ryu *et al.*, 2019).

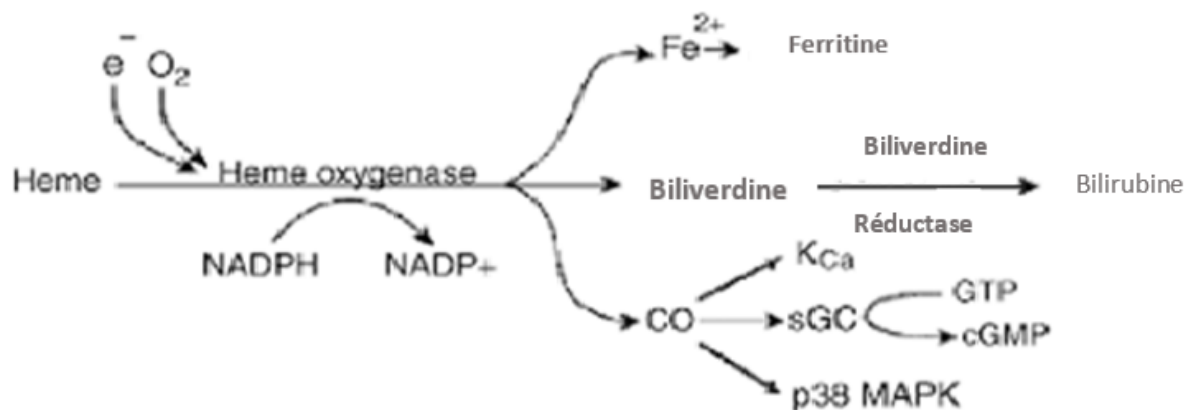


Figure 16 : Mode d'action de l'hème oxygénase (Ryu *et al.*, 2019)

IV.1.2.3- Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2 (Nrf2)

Les cellules luttent contre les différents stress grâce à la combinaison de mécanismes de réparation et de défense antioxydante. Le système de défense antioxydante est le mécanisme de protection majeur ; les cellules utilisent les antioxydants pour neutraliser les ERO générées par les molécules oxydantes et/ou électrophiles.

Les antioxydants « directs » (glutathion et vitamines) ont une courte durée de vie, sont consommés durant le processus de détoxication et nécessitent d'être régénérés pour exercer leur effet protecteur. Les antioxydants « indirects », quant à eux, exercent leur effet via l'augmentation de l'expression de protéines telles que la NAD(P) H, Quinone Oxidoréductase-1 (NQO1), la Superoxyde Dismutase (SOD), la Glutathione S-Transférase (GST), la Glutathione Peroxidase (GPx), l'Hème Oxygenase-1 (HO-1), la Glutamate-Cystéine Ligase (GCL), la catalase (CAT), et la Thioredoxine 1 (Trx1). Ces protéines ont une longue durée de vie, ne sont pas consommées durant le processus antioxydant, sont capables de catalyser une large variété de réactions de détoxication et sont impliquées dans la régénération de divers antioxydants directs comme le glutathion (GSH).

La régulation de la réponse antioxydante est assurée par le facteur de transcription Nrf2 et son inhibiteur endogène Keap1 via les séquences ADN « *Antioxidant Response Elements* » (ARE). La voie Nrf2/Keap1 régule au niveau transcriptionnel une batterie de protéines cytoprotectives participant ainsi activement au métabolisme et au maintien de l'équilibre rédox de la cellule. Le Nrf2 est exprimé de façon ubiquitaire: il est présent dans de

nombreux organes détoxifiants comme le foie et les reins ainsi que dans la peau, les poumons, le tube digestif et les muscles (Rojo de la Vega *et al.*, 2017).

IV.2. Méthode de prévention du vieillissement cutané

IV.2.1- Méthode basée sur l'utilisation des produits cosmétiques

La prévention est sans doute la méthode la plus efficace en matière de retardement de l'apparition des signes du temps. L'industrie cosmétique offre un panel important d'actifs. Les formulations renferment des actifs toujours plus innovants visant à renforcer la défense contre le stress oxydatif, contre les rayons UV et qui agissent sur la relance de synthèse au niveau cellulaire (Hulya Celik Onar, 2012). Ils peuvent être incorporés à la fois dans des produits d'hygiène (gel douche, gommage, pains, ...) et dans des produits de soin (crème, lait, masque, ...). Les composés synthétiques contenus dans ces produits utilisés pour le soin de la peau tels que l'arbutin, l'éther d'éthylascorbique, le rétinol, l'adénosine, le rétinyl palmitate et l'hydroquinone causent des irritations cutanées, les dermatites et sont souvent toxiques et mutagéniques (Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011).

IV.2.2- Méthode basée sur l'utilisation des plantes médicinales

La médecine populaire utilise une gamme variée de plantes dont certaines ont déjà fait l'objet d'étude scientifique (tableau III).

V- Méthodes d'induction du vieillissement cutané au laboratoire et d'évaluation des propriétés antiviellissement cutané des plantes médicinales/produits cosmétiques

Pour évaluer les propriétés antiviellissement cutanées des plantes médicinales, des méthodes *in vivo* et *in vitro* sont utilisées.

V.1- Méthode *ex-vivo* et *in vivo*

Une exposition aux rayons UV induit la stimulation des métalloprotéinases, de la melanogenèse, la dégradation des macromolécules et une augmentation des EOR dans les tissus de la peau humaine. La peau est alors traitée par les extraits de plantes 48 heures avant l'irradiation par les rayons UV puis l'expression des métallo protéinases et des macromolécules (collagène, élastine etc.) est ensuite évaluée (Bravo *et al.*, 2017; Fisher *et al.*, 1997). Une autre approche est qu'on applique sur le bras des personnes les produits cosmétiques ou les extraits de plantes pendant 24 h puis les conditions de la peau sont testées pour la recherche des éventuelles irritations en comparaison avec les bras témoins (Kim *et al.*, 2011).

Tableau III : Quelques plantes aux propriétés anti-âge et leurs mécanismes d'action.

Plantes	Composés isolés	Modèle d'étude	Mode d'action	Références
<i>Pinus densiflora</i> Siebold	Acide déhydroabiétique	<i>In vivo</i> (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Stimule la sécrétion du collagène dans les fibroblastes humains, impliquées dans la voie de signalisation de DAF-16	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
<i>Allium sativum</i> L.	Acide caféique, uracile, S-allyl cystéine	<i>In vivo</i> (souris)	Inhibition la dégradation du procollagène de type I et des matrices métalloprotéinases ; réduction du stress oxydatif et modulation du NF-KB et AP-1	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Daucus carota</i> L.	Glycoprotéine	Culture cellulaire	Neutralise les EOR ; protège la membrane cellulaire et joue un rôle de photoprotection	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>Hedysarum austrosibiricum</i>	Polysaccharides	Rats et souris agés	Inhibition de la production du malondialdéhyde ; activation des enzymes antioxydantes et réduction du stress oxydatif	Dong <i>et al.</i> , 2013
<i>Helichrysum niveum</i> Graham	Dérivés d'acylphloroglucinol	<i>In vitro</i> (essai enzymatique)	Réduction de l'ion ferrique, de la peroxydation lipidique ; possède une activité antityrosinase et une capacité antioxydante élevée	Popoola <i>et al.</i> , 2015

Tableau III (suite) : Quelques plantes aux propriétés antiviellissement et leurs mécanismes d'action.

Plantes	Composés isolés	Modèle d'étude	Mode d'action	Références
<i>Passiflora caerulea</i> L.	Chryisine	In vivo (souris)	Diminution significative des espèces oxygénées réactives et activation des enzymes antioxydantes (péroxydase, catalase, glutathion).	Souza et al., 2015
<i>Gardeniar jasminoides</i>	Geniposide	In vitro (fibroblaste humains)	Antioxydant, stimulation des enzymes antioxydantes inhibition des dégâts induits par les UV B	Shin et al., 2018
<i>Arctium lappa</i> L.	Arctigenine, matairesinol, arctiin, lappaol A, C et F	In vivo (Caenorhabditis elegans)	Prolongation de l'espérance de vie C. elegans, réduction du stress oxydatif	Su et Wink, 2015
<i>Astragalus membranaceus</i>		Culture cellulaire (kératinocytes et fibroblastes)	Augmentation de l'acide hyaluronique et de l'expression de la télomérase reverse	Hsu et Chiang, 2009
<i>Camellia sinensis</i> L.	Catéchine, épigalocatéchine, épigalocathéchine-3-gallate	In vivo (Essais cliniques)	Photoprotecteur, réduction des rides, anti inflammatoire, antioxydant.	Nichols et Katiyar, 2010
<i>Centella asiatica</i> L.	Madecassoside, asiaticoside, centeloside, acide asiatique	In vivo (essais cliniques)	Induction de la synthèse du collagène-1, augmentation de l'hyperplasie cellulaire, protection de l'ADN, antiinflammatoire	Hafttek et al., 2008

Tableau III (fin) : Quelques plantes aux propriétés anti-âge et leurs mécanismes d'action

Plantes	Composés isolés	Modèle d'étude	Mode d'action	Références
<i>Curculigo orchioides</i> G.	Curculoside	Culture cellulaire	Inhibition du MMP-1	Li et al., 2009b
<i>Curcuma longa</i> L.	Curcumine, xanthorrhizol	In vivo (souris)	Inhibition de l'expression de la MMP-2, réduction de la pigmentation et des rides dues à l'exposition des UV-B.	Sumiyoshi et Kimura, 2009
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Xanthorrhizole	In vitro (fibroblastes humains)	Inhibition de l'expression de la MMP-1 et induction de la synthèse de collagène-1	Oh et al., 2009
<i>Panax ginseng</i> L.	Ginsenoside	Essais cliniques	Activation de l'expression du collagène-1 et TGF- β 1, inhibition de l'expression du MMP-9	Cho et al., 2009 Lee et al., 2009
<i>Terminalia chebula</i> Retz	1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	Antityrosinase, antioxydant, anti prolifératif anti élastase, anti hyaluronidase ; stimulation de la production de collagène-2	Manosroi et al., 2010a;

TGF- β 1 : Transforming Growth Factor β 1 ; MMP : Matrix Metalloproteinase ; UVB : Ultraviolets B ; NF-KB : Nuclear Factor Kappa Beta ; AP-1 : Activator Protein 1 ; EOR : Espèces Oxygénées Réactives.

V.2- Méthode *in vitro*

Les enzymes purifiés tels que la tyrosinase, l'élastase, la collagénase, 92-kd gélatinase (Fisher *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2011) sont mis en présence de leurs substrats puis l'effet inhibiteur des extraits de plantes sur ces enzymes est évalué à travers plusieurs tests (test anti élastase, anti tyrosinase et anti collagénase). Les tests antioxydants et anti-inflammatoires sont également réalisés avec les extraits pour réduire les productions des EOR et limiter les inflammations (Lee *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2017; Moon *et al.*, 2010). En outre, les cultures des cellules telles que les mélanocytes, les fibroblastes, keratinocytes ... sont aussi réalisées et on observe leur prolifération, et l'effet sur la biosynthèse de la mélanine, du collagène, de l'élastine des métallo proteinases ainsi que sur les marqueurs du stress oxydatif intracellulaire sont également évalués (Arung *et al.*, 2011; Manosroi *et al.*, 2010b; Rojo de la Vega *et al.*, 2017).

V.2.1- Tests d'inhibition des enzymes

- Test anti élastase

L'élastase (EC 3.4.21.36) est une enzyme de la classe des hydrolases. Sa température optimale et pH optimum d'activité sont 25°C et 8,0 respectivement. Cette enzyme hydrolyse les liaisons peptidiques du côté c-terminal des peptides portant les acides aminés alanine, valine et glycine. Le substrat de l'enzyme est le N-succinyl-ALA-ALA-ALA p-Nitroalunide (sucAla3-PNA) et il est utile pour mesurer l'activité de l'enzyme par spectrophotométrie.

- Test anti tyrosinase

La tyrosinase (EC 1.14.18.1) est une enzyme de la classe des oxydoréductases. Sa température optimale et pH optimum d'activité sont 37°C et 6,5 respectivement. L'aptitude de cette enzyme à oxyder son substrat, la L-tyrosine ou la L-dopa est mesurée par spectrophotométrie.

- Test anti collagénase

La collagénase (EC 3.4.24.3) est une enzyme de la classe des hydrolases. Sa température optimale et pH optimum d'activité sont 25°C et 8,8 respectivement. Cette enzyme a une activité à la fois de carboxypeptidase et endopeptidase ; l'endopeptidase coupe dans la région de la triple hélice du collagène, tandis que la carboxypeptidase digère successivement les extrémités exposées Gly-X-Y. Le substrat de l'enzyme est le furylacryloyl-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) et il est utile pour mesurer l'activité de l'enzyme par spectrophotométrie à 340 nm.

V.2.2- Tests antioxydants

L'activité antioxydante des extraits est évaluée en mesurant les propriétés des extraits ou des composés à être :

- **Antiradicalaire**

Les tests utilisés sont dans ce cas: le test du piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) au cours duquel on note une décoloration de la solution de DPPH (du violet au jaune), le test de piégeage du radical hydroxyl (HO°) généré par la réaction de Fenton, le test de piégeage du radical cationique acide 2,2'azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique ammonium (ABTS°+) décolorant cette solution (du vert à l'incolore) et le test de mesure des espèces oxygénées réactives intracellulaire en utilisant Le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H₂DCFDA) qui est une molécule capable de pénétrer dans les cellules où il est deacéthylé par les estérases cellulaires pour former un produit non fluorescent, le 2'7'-dichlorodihydrofluoresceine (H₂DCF) (**Bravo et al., 2017**).

- **Chélateur des métaux**

Les méthodes qui utilisent ce principe sont: *le Ferric Reducing Antioxydant Power* (FRAP), cette méthode évalue le transfert d'électron d'un antioxydant vers un accepteur d'électron, le 2, 4, 6-tripyridyl-5-triazine ferrique (TPTZ), une molécule incolore qui, lorsqu'elle est réduite en 2, 4, 6-tripyridyl-5-triazine ferreux devient bleue intense, ce qui permet de la quantifier par spectrophotométrie; le *Total Radical-trapping Antioxydant Parameter* (TRAP) qui mesure la capacité d'un antioxydant à inhiber l'action des radicaux peroxydes générés par une sonde fluorescente le 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Elle mesure la durée de l'inhibition de l'activité antioxydante d'un échantillon comparativement à celle du TROLOX, une molécule antioxydante possédant une structure similaire à celle de la vitamine E (**Lee et al., 2011; Moon et al., 2010**).

- **Réducteur des oxydants**

Les tests utilisés sont: le test de réduction du ferricyanure de potassium en un précipité bleu de ferrocyanure de potassium; le test de mesure de la capacité antioxydant par réduction du complexe phosphomolybdique en un complexe phosphomolyb-2-molybdique (**Lee et al., 2011; Moon et al., 2010**).

- **L'inducteur de la biosynthèse des enzymes anti-oxydantes**

Les études mettent en évidence la capacité des extraits de plantes à stimuler la synthèse des ARN messagers des enzymes antioxydantes (NAD(P)H, NQO1, SOD, GST, GPx, HO-1, GCL, CAT, Trx1 et par conséquent à augmenter leur niveau d'expression via le

facteur de transcription *Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2* (Nrf2) (**Rojo de la Vega et al., 2017**).

Tous ces tests sont souvent mis à profit pour évaluer l'aptitude des extraits de plantes à protéger les biomolécules contre l'oxydation. Ainsi, on peut analyser la propriété de ces extraits ou composés à inhiber : la peroxydation lipidique (dosage du MDA), l'oxydation de l'ADN (dosage du 8-hydroxy 2-désoxyguanosine) et l'oxydation des protéines (dosage du groupement carbonyle) (**Bonnefont-Rousselot, 2007**).

V.2.3- Tests anti- inflammatoires

Les enzymes sont mises en présence de leurs substrats puis l'effet inhibiteur des extraits de plantes sur les enzymes purifiées (la phospholipase, la cyclo-oxygénase-2 et les lipoxygénases) est évalué. Les tests d'inhibition de l'oxyde nitrique par les extraits de plantes sont également réalisés sur les macrophages activés.

- Test anti cyclo-oxygénase

La cyclo-oxygénase (EC 1.14.99.1) est une enzyme de la classe des oxydoréductases. Elle convertit l'acide arachidonique en prostaglandine H2 selon une réaction en deux étapes : une réaction d'oxydation qui convertit l'arachidonate en prostaglandine G2 (PGG2) et une réaction de réduction dans laquelle la PGG2 est réduite en prostaglandine H2 (PGH2). Le produit de la réaction est évalué au spectrophotomètre (**Lin et al., 2017**).

- Test anti-lipoxygénase

La lipoxygénase EC (1.13.11.31), est une oxydoréductase qui catalise la peroxydation stéréospécifique des acides gras polyinsaturés libres et estérifiés. Elle convertit l'acide arachidonique en acide 12-hydroperoxyéicosatétraénoïque/12-HPETE et en acide 15-hydroperoxyéicosatétraénoïque/15-HPETE. Elle convertit également l'acide linoléique en acide 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque. Elle peut également agir sur l'acide (12S) -hydroperoxyéicosatétraénoïque/(12S) -HPETE pour produire de l'hépoixiline A3. Sa température optimale et pH optimum d'activité sont 25 °C et 7,4, son activité est mesurée au spectrophotomètre à 560 nm (**Jameson et al. 2014**).

- Dosage des nitrites à travers la culture des macrophages

Les macrophages en conditions physiologiques normales, produisent une quantité faible de médiateurs pro-inflammatoires tels que les substances réactives et les cytokines. Une fois activés, les macrophages amplifient la production de ces composés présentant ainsi une activité cytotoxique accrue (**Galván-Peña and O'Neill, 2014; O'Neill, 2016**). Les cellules

sont traitées avec du lipopolysaccharides (LPS), un composant de la paroi des bactéries GRAM qui est capable d'activer les macrophages à travers le récepteur TLR-4 pendant 24 heures. La viabilité des macrophages et la production de monoxyde d'azote par les macrophages stimulés ou non avec du LPS via la production de nitrites, un composé dérivé du NO sont réalisées.

V.2.4- Test anti- mélanogènèse

Les cellules de mélanome murine B16F10 sont largement utilisées pour l'évaluation de l'effet anti-mélanogènèse, probablement parce qu'elles sont relativement faciles à cultiver et qu'elles partagent la plupart des mécanismes de mélanogènèse des mélanocytes humains normaux (**Pillaiyar et al., 2017**). Les cellules sont cultivées dans les conditions appropriées et l'expression des gènes de la pigmentation (TYR, TRP1, DCT...) en réponse à une stimulation par les rayons UV ou la MSH est déterminée par les techniques de Réaction de Polymerisation en Chaîne (PCR) et ou de *Western blot* permettant une quantification globale et rapide des niveaux protéiques

V.2.5- Evaluation de la biosynthèse du collagène

Les fibroblastes humains et des souris sont utilisés. Particulièrement la lignée cellulaire des souris NIH/3T3 car elle synthétise un taux élevé (75 à 90%) de collagène de type I et se cultive facilement. Les cellules sont exposées aux facteurs environnementaux puis les niveaux du collagène de type 1 et metalloproteinases sont évalués par des méthodes de biologie moléculaire (**Bravo et al., 2017**).

V.3- Méthode *in silico* par *docking moléculaire*

Le docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique (**Guerrero-Perilla et al., 2015**). Le docking moléculaire a pour but de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules. Une simulation de *docking* comprend essentiellement deux étapes représentées par la figure 17 :

- Le *Docking* (la première étape) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.

- Le *Scoring* (la deuxième) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de *docking*. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées.

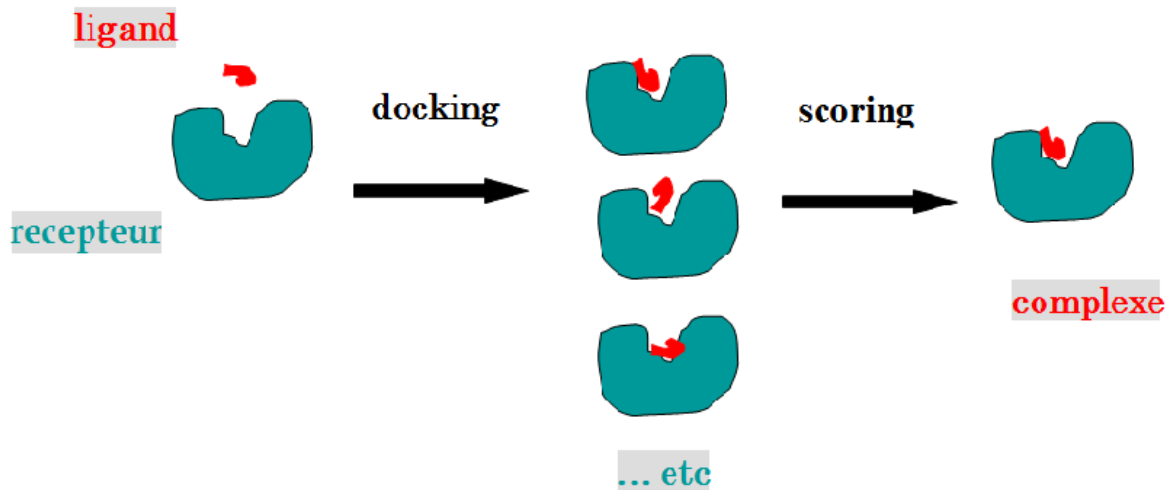


Figure 17: Les étapes du *docking moléculaire* (Chaurasiya *et al.*, 2016)

Pour mener à bien le processus de docking moléculaire, plusieurs bases de données et logiciels sont utilisés :

La *protein data bank* (PDB) qui contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN. Nous avons représenté dans la figure 18 ci-dessous la structure de deux enzymes élastase et lipoxygénase obtenue par cristallographie. L'élastase sur PDB (1B0E) et la La lipoxygenase sur PDB (1F8N) cristallisent sous la forme d'un dimère le modèle de l'enzyme (figure 18) retenu après élimination des molécules d'eau et des hétéroatomes de la Co-cristallisation.

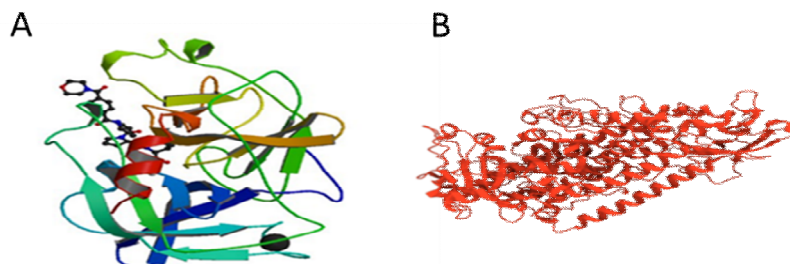


Figure 18 : Structure cristallographié des enzymes <http://www.pdb.org>

(A) L'enzyme élastase (1B0E) ; (B) L'enzyme lipoxygénase (1F8N).

Unipro <https://www.uniprot.org/uniprot/>, qui permet d'étudier les séquences d'acides aminés, le site actif de l'enzyme ainsi que les molécules qui interagissent au niveau du site actif; Pub Chem; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> qui est une base de données de structures chimiques des ligands. Ces structures sont représentées par les programmes d'informatique de modélisation moléculaire et gouvernées par les lois de la chimie quantique.

Dans les procédures de docking, la protéine est considérée comme un corps rigide, la flexibilité du ligand seule est prise en compte pour l'obtention de complexes. Selon la méthode utilisée pour générer les conformères du ligand et les placer dans la cavité catalytique du récepteur, plusieurs algorithmes peuvent être utilisés. Parmi lesquels AutoDock Vina 4.2 couramment utilisé pour calculer l'énergie libre de liaison entre les molécules isolées et les cibles biologiques choisies. Il utilise des champs de force de désolvation basés sur des charges et des modèles améliorés bien définis de l'état non lié. Les calculs d'amarrage tentent de placer le ligand dans les sites de liaison de la cible. A la fin de chaque cycle d'exploration, AutoDock Vina enregistre les meilleures conformations amarrées avec une énergie minimale de liaison. L'interface AutoDock Vina nous permet aussi de suivre les étapes suivantes: les noms des fichiers contenant le récepteur et ligand et la représentation de la macromolécule (enzyme) avec ses hydrogènes polaires ainsi que les charges partielles de tous ses atomes (Guerrero-Perilla *et al.*, 2015). Les différentes conformations (poses) et les interactions protéine-ligand ont été visualisées par le logiciel LigPlot.

Méthodologie des calculs

La procédure de *docking* permet de générer une liste de complexes représentant les modes d'association favorables entre le ligand et le récepteur macromoléculaire. L'étape suivante consiste à évaluer ces complexes, afin de trouver celui ou ceux les plus susceptibles de reproduire au mieux le mode d'association réel. L'association entre protéines et ligands est gouvernée par plusieurs paramètres thermodynamiques :

- les interactions hydrophobes,
- les interactions électrostatiques,
- les liaisons hydrogène,
- les effets de solvation et les effets d'entropie.

Le calcul de l'énergie de liaison (ΔG de liaison) tient compte de tous ces paramètres. Théoriquement, le complexe est favorable si la variation d'énergie libre globale de complexation est négative (ΔG complexation < 0).

VI- Travaux antérieures sur les plantes étudiées

VI.1- *Harungana madagascariensis*

H. madagascariensis est une Hypericaceae communément appelée « harongue ou haronga », originaire de Madagascar, cet arbre pousse dans les forêts d'Afrique tropicale. Au Cameroun, cette plante est appelée *Febai* par les Babungo, *Tûne* par les Bamoun et Atondo par les Béti (Orwa *et al.*, 2009).

Cet arbuste est d'une hauteur maximale d'environ 4 à 7 mètres et sécrète une sève de couleur orange. Les feuilles opposées de couleur vert foncée mesurent 10-20 cm de long et 6-10 cm de large avec de nombreuses nervures et un pétiole de 1,5-2 cm de long. Ses feuilles possèdent à leur extrémité terminale des fleurs blanchâtres très petites et nombreuses. Ses jeunes fruits en drupes, de 2 à 4 millimètres de diamètre, sont de couleur orange et deviennent rouges à maturité, atteignant alors 25 à 30 centimètres de diamètre (figure 19) (Orwa *et al.*, 2009).

H. madagascariensis est utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. L'écorce ainsi que les feuilles sont inhalées afin de traiter les maladies du foie, la sève et les écorces comme vermifuge et pour les maladies cutanées (mycoses, irritations, gale, démangeaisons, etc.), en application externe. La gomme est indiquée pour les coupures et la résine traite les coliques alors que l'infusion d'écorces est utilisée dans les traitements de la dysenterie et chez les bébés, dans les traitements de la constipation et des flatulences. Pour les problèmes gynécologiques (fausse couche, dysménorrhée, etc.), on préconise une décoction à base d'écorces ou de racines. Le fruit sert également de laxatif lorsqu'il est mangé cru et peut provoquer des vomissements. Les effets antibactériennes, antifongiques et antiviral (Moulari *et al.*, 2006) et son utilisation dans la gestion du paludisme par les tradipraticiens sont bien connus au Cameroun. Cette plante médicinale est également utilisée en Afrique et en Europe pour ses effets antidiabétique et antidiphtérique (Nimenibo-Uadia and Nwachukwu, 2017).

Les travaux antérieurs disponibles sur cette plante sont essentiellement phytochimiques et rapportent l'isolement des Bazouanthrone feruginin A, harunganin, harunganol A, harunganol B, friedelan-3-one et acide betulinique aux activités anti-plasmodiales (Lenta *et al.*, 2007). L'extrait aqueux des feuilles a montré un effet favorable sur la réduction du taux de cholestérol et de glucose dans le sang chez le rat (Nimenibo-Uadia and Nwachukwu, 2017). Les extraits des feuilles et écorces ont démontré une activité anti-protozoaire, antibactérienne et anti-inflammatoires (Iwalewa *et al.*, 2008).

VI.2- *Psorospermum aurantiacum*

P. aurantiacum est un arbrisseau de la famille des Hypericaceae. On le rencontre généralement dans l'ensemble de l'Afrique tropicale et équatoriale (Galle, 2015). L'arbre a environ 3 à 5 m de haut. Il est remarquable par ses feuilles généralement opposées plus rarement sub-opposées ou alternées et présentant souvent des ponctuations granulaires et sombres et des poils étoilés denses d'un brun orangé qui tapissent la face inférieure de la feuille, contrastant avec le noir brillant du dessus, lorsqu'elle est sèche (figure 20). Les fleurs hermaphrodites sont composées de cinq sépales villoses munies de gletes longitudinales linéaires (Epifano *et al.*, 2013). Le fruit est une baie et les graines sont larges et présentant des gletulations ponctuées.

Une décoction des feuilles et écorces est utilisée pour le traitement d'infections gastro-intestinales, urinaires, les maladies vénériennes, la stérilité et l'épilepsie. L'utilisation des racines et écorces et rarement les feuilles en application locale essentiellement sous forme de cataplasme soigne les problèmes dermatologiques (Epifano *et al.*, 2013)

Les travaux antérieurs disponibles sur cette plante rapportent que l'extrait des feuilles possède des activités antioxydant et antimicrobial (Tchakam *et al.*, 2012). Les extraits de *P. aurantiacum* sont riches en anthronoides et anthraquinones.

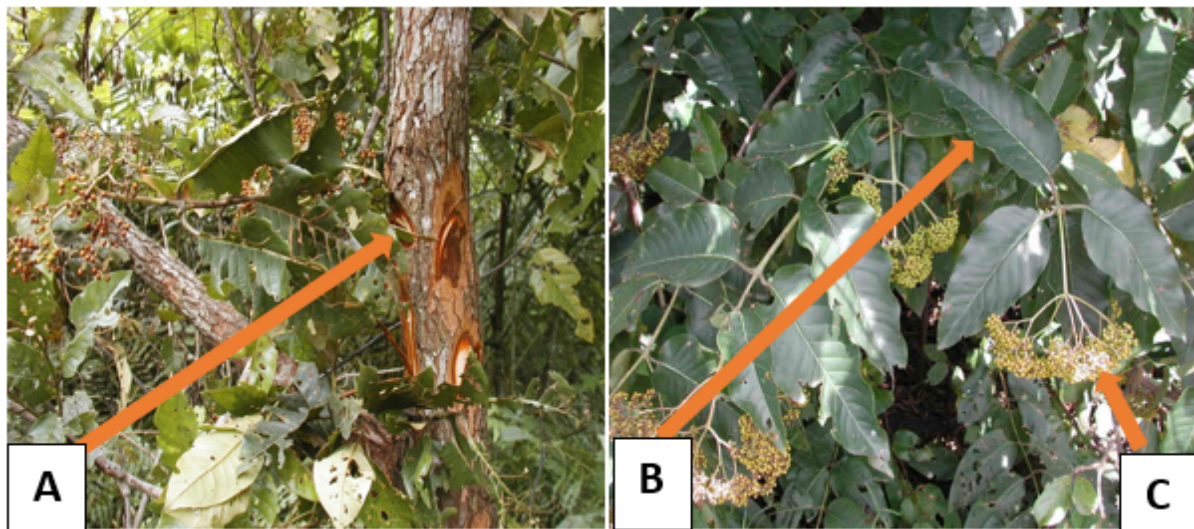


Figure 19 : Photographie de *Harungana madagascariensis* (Photo Manjia)

A= Tige ; B= Feuilles ; C= Fleurs.

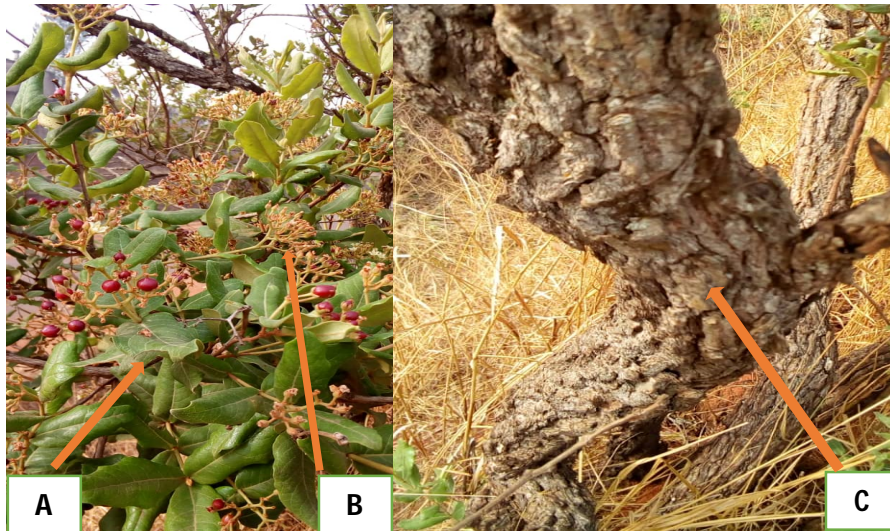


Figure 20 : Photographie de *Psorospermum aurantiacum* (photo Manjia)

A= Feuilles ; B= Fleurs ; C= Tige.

De récentes études par ailleurs, ont démontré que les extraits au mélange chlorure de méthylène/méthanol (1 :1 v/v) des écorces de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum* possèdent de fortes propriétés antioxydantes, anti-tyrosinase et anti-elastase. (Manjia, 2012). Cependant, à notre connaissance, aucune étude démontrant les mécanismes moléculaires des propriétés anti-âge cutané de ces plantes ainsi que de leurs fractions n'a encore été menée.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1- Matériel

II.1.1- Matériel végétal

Les écorces de tronc de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* ont été récoltées entre 6 heures et 11 heures de la matinée en Avril 2016 dans la localité de Fouban (Département du Noun) à l'Ouest Cameroun. L'identification de la plante a été faite par comparaison à un spécimen déposé sous les références 22866/SRF/cam et 16855/SRF/cam respectivement par M. Nana Victor, Taxonomiste des plantes, à l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé.

II.1.2- Lignées cellulaires.

Les cellules utilisées dans cette étude ont été obtenues au *National Centre for Cell Science* (NCCS, Pune, India) et conservées dans l'azote liquide. Chaque lignée cellulaire était réactivée et mise en culture au moment de l'expérimentation. Trois lignées cellulaires de caractéristiques différentes ont été utilisées.

II.1.2.1- Les cellules NIH/3T3

La lignée cellulaire nommée « NIH/3T3 » est un fibroblaste adhérent qui dérive directement des embryons des peaux de souris. En raison de leur origine embryonnaire et de leurs capacités extensives de prolifération et de différenciation, ces cellules offrent l'opportunité unique d'étudier de nombreux aspects de la biologie.

II.1.2.2- Les cellules B16F10

Les cellules de mélanome de souris B16F10 sont largement utilisées pour l'évaluation de l'effet anti-mélanogénèse, probablement parce qu'elles sont relativement faciles à cultiver *in vitro* et qu'elles partagent la plupart des mécanismes de mélanogénèse avec les mélanocytes humains normaux.

II.1.2.3- Les cellules RAW 264.7

La lignée cellulaire RAW 264.7 est une lignée de macrophages d'origine murine. Les cellules RAW 264.7 sont des cellules de type monocyte / macrophage, provenant de la lignée cellulaire transformée par le virus de la leucémie Abelson et dérivée de souris BALB/C. Ces cellules sont décrites comme un modèle approprié de macrophages et elles sont utilisées pour étudier les réponses cellulaires aux microbes et à leurs produits. Elles sont capables de pratiquer la pinocytose et la phagocytose. Lors de la stimulation par le LPS, les cellules RAW 264.7 augmentent la production d'oxyde nitrique (NO) et renforcent la

phagocytose. Ces cellules sont souvent utilisées pour cribler des produits naturels en vue d'activités anti-inflammatoires ou immunomodulatrices et pour prévoir leur effet potentiel *in vivo* ou sur des cellules primaires. De plus, ces cellules sont capables de tuer les cellules cibles par cytotoxicité dépendant des anticorps. Lorsque les cellules RAW 264.7 sont stimulées par l'activateur des récepteurs du ligand du facteur nucléaire κ B, elles se différencient en ostéoclastes.

II.1.3- Réactifs et appareils

II.1.3.1- Réactifs

Élastase (type VI), N-Suc- (Ala) 3-P-nitroanilide (sucAla3-PNA), tyrosinase, L-tyrosine, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), persulfate de potassium, ferrozine, sulfate ferreux, le ferricyanure de potassium, l'acide trichloroacétique, le chlorure ferrique, le nitroprussiate de sodium, l'acide L-ascorbique, le réactif de Folin-Ciocalteu, ont été achetés au laboratoire Prolabo (Paris, France) et à Sigma – Aldrich (Hambourg, Allemagne). Tous les produits chimiques pour la Biologie Moléculaire ont été achetés. Le bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium (MTT) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été fournis par Sisco Research Laboratory Pvt. Ltd. (Mumbai, Inde). Le sérum foetal bovin (FBS), le milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), le phosphate de trypsine versène (TPVG) et la solution antibiotique-antimycotique ont été achetés dans les laboratoires Hi-media (Mumbai, Inde). Le réactif TRIzol, DreamTaq et Green master mix ont été obtenus auprès de *Invitrogen* (CA, USA). Le kit de synthèse d'ADNc iScript a été acheté à Bio-Rad (CA, USA). Le fibroblaste embryonnaire des peaux de souris (NIH / 3T3) et les cellules de mélanome de la peau de souris (B16F10) ont été obtenus au *National Center for Cell Science* (NCCS, Pune, Inde). La 15-lipoxygénase de la Glycine max a été achetée auprès de Prolabo (Paris, France) et de la compagnie Sigma – Aldrich (Hambourg, Allemagne). Le tris (hydroxyméthyl) aminométhane a été acheté chez Sigma (Suisse). Le sérum foetal de veau (FCS) et la pénicilline / streptomycine / fongizone (PSF) ont été obtenus auprès de Highveld Biological Products (Afrique du Sud). Le tampon phosphate saline (PBS) et la trypsine ont été achetés chez Whitehead Scientific (Afrique du Sud).

II.1.3.2- Appareils

Chromatographe liquide Series 1200 (Agilent Technologies, Ca, USA) ; Spectromètre de masse à haute résolution Agilent 1200 HPLC/6520 ; Spectromètre BRUKER AV 500 SPECTROMETER ; Lecteur de plaque ELX800 (Bio-Tek instruments, Inc., Winooski, VT) ; Spectrophotomètre uv/vis ; Incubateur à CO₂ 5% ; Centrifugeuse réfrigérée de marque Thermo Fischer Scientific ; Vortex ; Bloc chauffant (Biorad Powerpac Universal System) ; Thermo-cycler Eastwin (Life Science) ; Thermo-cycler Applied Biosystems 7500 System ; Microscope à fluorescence Advance Microscopy Groups ; Microscope optique à phase inverse de marque OLYMPUS AXIOVERT 40C. UVB lamp (Luchem-UVB Lamps) ; LZC-4X (Canotek, Canada) ; Bain-marie (UNITRONIC P-SELECTA) ; Spectrophotomètres (GENESYS, HACH) ; Balance à précision (SARTORIUS) ; Rotavapor (HEIDOLPH WB 2000) ; Agitateur magnétique (HEIDOLPH) ; Pompe à vide (Synergy, USA).

II.2- Méthodes

II.2.1- Préparation de l'extrait brut et des fractions des plantes

➤ Selection des extraits bruts de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum*

Vingt six (26) plantes médicinales utilisées par les populations de Foumban (Ouest-Cameroun) et Nkol Anga'a (Centre-Cameroun) contre les affections de la peau ont été répertoriées et extraites avec le mélange méthanol-chlorure de méthylène (1:1 v/v). Les activités antioxydante et inhibitrice de l'activité des enzymes élastase et tyrosinase des 27 extraits préparés ont été étudiées *in vitro* ainsi que leur composition phytochimique et leurs teneurs en polyphénol totales. Les résultats ont démontré le potentiel antiviellissement cutané élevé des extraits bruts des écorces de *H. madagascariensis* et, des écorces et feuilles de *P. aurantiacum* (Manjia, 2012).

➤ Préparation de l'extrait brut

Les écorces de *H. madagascariensis* et, les écorces et feuilles de *P. aurantiacum* ont été découpées, lavées, séchées à l'air libre à l'ombre pendant 2 semaines et broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Cinq cent grammes de poudre obtenue ont été extraits par macération dans 1L du système dichlorométhane (CH₂Cl₂)/méthanol (CH₃OH) (1:1, v/v) pendant 24h. Le mélange était remué régulièrement à l'aide d'une baguette de verre. Le macérât collecté a été filtré sur papier whatman N°1 et le filtrat concentré sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait final obtenu a été séché à l'étuve à une température de 50°C, pour donner une croûte de couleur marron foncé de masse 90,09 g pour *H. madagascariensis* et, 79 g et 60 pour les écorces et feuilles de *P. aurantiacum* respectivement.

➤ Préparation des différentes fractions

L'extrait brut a été dissout dans de l'eau distillée puis fractionné par séparation liquide-liquide de polarité croissante en utilisant tour à tour : de l'hexane, du chlorure de méthylène, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. A la fin, un résidu qui s'oxyde à la lumière a été obtenu. Le liquide recueilli à chaque fois a été concentré à l'évaporateur rotatif puis séché à l'étuve à une température de 50°C pour donner les différentes fractions. La figure 21 ci-dessous représente la procédure de fractionnement de l'extrait brut. Quatre fractions ont été obtenues pour chaque plante, chacune dans un solvant donnée: HMB, *H. madagascariensis* extrait brut; HMH, *H. madagascariensis* fraction à l'hexane; HMC, *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA, *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM, *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB, *P. aurantiacum* extrait brut; PAH, *P. aurantiacum* fraction à l'hexane; PAC, *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA, *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM; *P. aurantiacum* fraction au méthanol. PABf, *P. aurantiacum* feuille extrait brut ; PAHf, *P. aurantiacum* feuille fraction à l'hexane ; PACf, *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène ; PAAf, *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle ; PAMf, *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol. L'extrait brut et les fractions ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

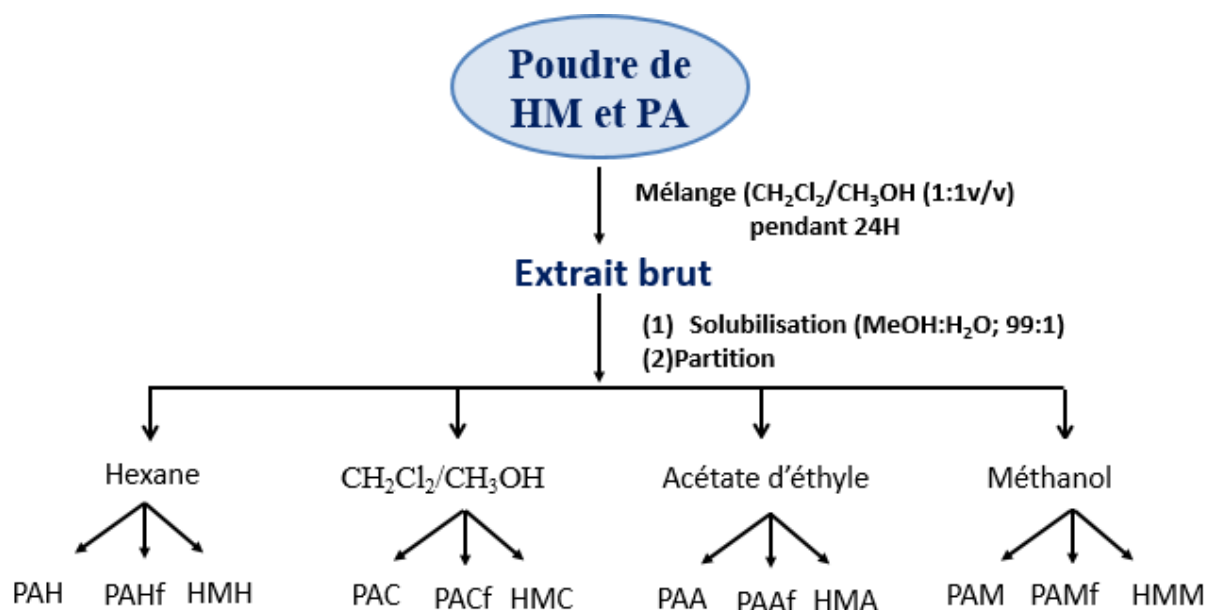


Figure 21 : Diagramme de fractionnement des extraits bruts

HMH: *H. madagascariensis* fraction à l'hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l'hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol.

II.2.2- Recherche *in vitro* des fractions de *H. madagascariensis* ou de *P. aurantiacum* possédant à la fois un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase

Dans le processus du vieillissement cutané, on note l'inflammation, le stress oxydatif et l'augmentation de l'activité des enzymes (élastase et tyrosinase) qui dégradent les composantes de la peau (Mukherjee *et al.*, 2011; Swalwell *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2017). Les fractions de plantes qui démontreront à la fois une activité antioxydante, une inhibition de la lipoxigénase, de l'oxyde nitrique et des enzymes (élastase et tyrosinase) seront considérées comme fractions actives et sélectionnées comme possédant un potentiel antiviellissement cutané pour la suite des expériences. Ainsi, nous allons tour à tour évaluer les propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et inhibitrices des enzymes tyrosinases et élastase des fractions de plantes.

II.2.2.1- Evaluation des propriétés antioxydantes des fractions de plantes

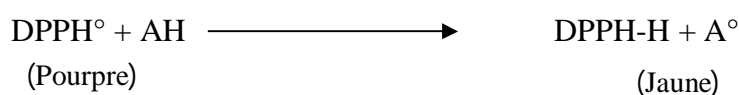
Au moment des analyses, chaque extrait de plante a été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO 100%) pur et testé en double aux concentrations finales de 0,1, 1, 10, 100 µg/mL. La vitamine C a été utilisée comme composé de référence et testée aux mêmes concentrations que les fractions de plantes. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

➤ Evaluation du pouvoir antiradicalaire

Le pouvoir antiradicalaire a été effectuée par le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) (Zengin *et al.*, 2010).

Principe

L'antioxydant (AH) stabilise le radical libre DPPH° en DPPH-H en lui transférant son atome d'hydrogène (H); ce qui entraîne un changement de couleur de la solution méthanolique de DPPH qui passe progressivement du pourpre au jaune selon la réaction ci-après. Cette décoloration est suivie par spectrométrie à 517 nm.



Mode opératoire

Dans chaque tube à essai contenant 3,1 mL de la solution méthanolique de DPPH 40 µg/mL, 50 µL de chaque fraction de plante ou le standard ont été ajoutés. Pour les tubes témoins négatifs, 50 µL de DMSO ont été ajoutés à la place de l'extrait. L'ensemble des tubes a été bien homogénéisé et incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance a été mesurée par spectrophotomètre à 517 nm et le pourcentage de piégeage a été calculé puis utilisé par la suite pour les calculs des concentrations nécessaires pour le piégeage de 50% des radicaux (CP₅₀), concentration efficace pour neutraliser 50% des radicaux DPPH (CE₅₀) et du pouvoir antiradicalaire (PA) selon les formules suivantes :

$$\% \text{ Piégeage} = \frac{D_{\text{Otémoin}} - D_{\text{Oessai}}}{D_{\text{Otémoin}}} \times 100 \quad (1)$$

$$CE_{50} = \frac{CP_{50}}{C}$$

$$PA = \frac{1}{CE_{50}}$$

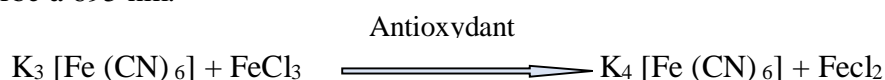
C = concentration de DPPH en mol/mL.

➤ Evaluation du pouvoir réducteur des fractions de plantes

Ce pouvoir a été évalué sur la capacité des fractions à transformer le ferricyanure de potassium en ferrocyanure de potassium (Patil *et al.*, 2009).

Principe

En milieu acide et en présence du chlorure ferrique, l'antioxydant transforme le ferricyanure de potassium K₃ [Fe (CN)₆] en un précipité bleu de ferrocyanure de potassium qui absorbe à 695 nm.



Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, introduit successivement 50 µL de chaque fraction de plante, 1100 µL de tampon phosphate (0,6 M ; pH 6,6), 1100 µL de ferricyanure de potassium 0,25%. Dans le tube blanc, 1100 µL d'eau distillée ont été ajoutés au lieu du ferricyanure de

potassium. Après incubation pendant 20 min à 50°C, nous avons ajouté dans tous les tubes, 1mL d'acide trichloroacétique (TCA) 10%. L'ensemble a été centrifugé (3000 trs/min, 10 min, 4°C) puis, à 1mL de surnageant ont été ajoutés 1 mL d'eau distillée et 200 µL de chlorure ferrique. L'ensemble a été bien homogénéisé, laissé au repos pendant 10 min puis l'absorbance a été mesurée à 700 nm contre le blanc.

II.2.2.2- Mesure de l'inhibition de l'activité de la tyrosinase et de l'élastase par les fractions de plantes

Les fractions ont été testées à la concentration de 100 µg/mL. Pour les fractions ayant au moins 50% d'activité, nous avons recherché les concentrations inhibitrice d'activité cinquante (CI₅₀) : concentration de l'extrait qui inhibe 50% d'activité de l'enzyme. Cette activité a été mesurée en utilisant l'élastase du pancréas du porc (E0127) et la tyrosinase de champignon *Aspergillus nidulans* (T3824).

➤ Effet des fractions de plantes sur l'activité de l'élastase

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Lee and Choi. (1999)**.

✓ Recherche de la zone linéaire de la courbe illustrant l'activité de l'élastase

Un test a été mené au préalable en mesurant l'activité de l'enzyme en présence et en l'absence d'inhibiteur (épigallocatechinegallate E4268) dans le but de déterminer la zone de linéaire. Zone où l'activité de l'élastase est constante en fonction du temps. Elle nous permettra alors de calculer les vitesses initiales de la réaction. Pour toutes les fractions, nous avons choisi d'effectuer ce calcul dans l'intervalle 60-180 secondes. La figure 22 ci-dessous illustre cette zone d'étude.

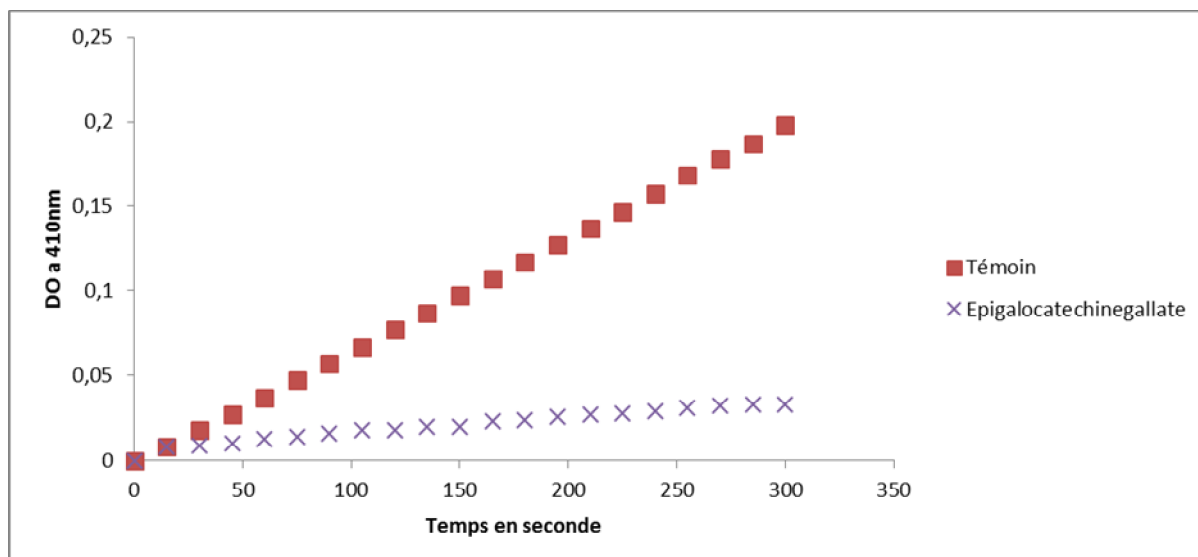
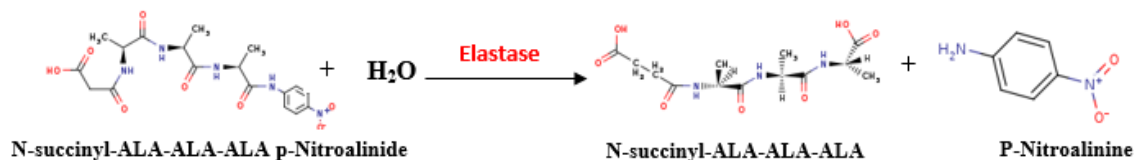


Figure 22 : Zone linéaire illustrant l'activité de l'élastase

Principe

Le N-succinyl-ALA-ALA-ALA p-Nitroalidine (sucAla3-PNA) est hydrolysé en présence de l'élastase pour donner le p-Nitroalinine de coloration jaune qui absorbe à un maximum de 410 nm selon la réaction ci après.



Réaction d'hydrolyse du N-succinyl-ALA-ALA-ALA p-Nitroalidine

Mode opératoire

Dans chaque cuvette de lecture, nous avons introduit successivement : 50 μ L de fraction de plante ou de l'épigallocatechinegallate (témoïn positif), 50 μ L de solution enzymatique 1 μ g/mL, 780 μ L de tampon Tris-HCl (pH 8,0; 0,2 M). Les tubes blancs contenaient le tampon à la place de l'enzyme et les témoins négatifs du DMSO (100%) à la place des fractions. Après incubation pendant 15 min à 25°C, nous avons ajouté 20 μ L de sucAla3-PNA 0,8 mM puis, nous avons homogénéisé par inversion après avoir bouché les cuvettes de lecture avec du papier parafilm. L'augmentation de l'absorbance du mélange a été suivie à 410 nm et les absorbances ont été enregistrées après chaque 15 secondes pendant 5

min. Les vitesses initiales de l'hydrolyse du substrat par l'enzyme ont été calculées dans la zone de linéarité et les pourcentages d'inhibition calculés selon les formules suivantes :

$$Vitesse = \frac{DO_{180} - DO_{60}}{t_{180} - t_{60}}$$

DO₁₈₀ et DO₆₀ = absorbance à 180 et 60 secondes respectivement.

t₁₈₀ et t₆₀ = temps 180 et 60 secondes respectivement.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{V_t - V_e}{V_e}$$

V_t = vitesse du tube témoin négatif

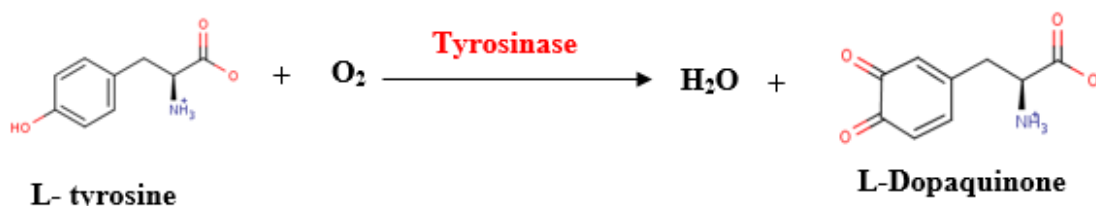
V_e = vitesse du tube essai

➤ Effet des fractions de plantes sur l'activité de la tyrosinase

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Manosroi *et al.* (2010a)**.

Principe

La L-tyrosine est oxydée en présence de la tyrosinase en 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) qui, lui aussi est rapidement oxydé sous l'action de cette même enzyme en dopaquinone de coloration brun marron qui absorbe à un maximum de 490 nm selon la réaction ci-après.



Réaction d'oxydation de la L-Tyrosinase

Mode opératoire

La méthode a été utilisée avec quelques modifications comme suit. Dans chaque tube à essai, nous avons introduit successivement : 250 µL de L-tyrosine 1,5 mM, 500 µL de tampon phosphate (pH 6,8, 0,1 M). Après pré-incubation pendant 15 min à 37°C, nous avons ajouté

50 µL de fraction de plante ou de la vitamine C (témoin positif) et 100 µL de solution enzymatique 31 unités/mL maintenue à 37°C. Les tubes blancs contenaient le tampon à la place de l'enzyme et les tubes témoins négatifs du DMSO (100%) à la place de l'extrait. L'ensemble a été incubé pendant 45 min à 25°C. La densité optique du mélange a été lue à 490 nm contre le blanc. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule (1).

II.2.2.3- Evaluation des propriétés anti-inflammatoires des fractions de plantes

L'effet anti-inflammatoire des fractions de plantes a été évalué en mesurant l'inhibition de l'enzyme 15-lipoxygénase d'une part, et en mesurant l'inhibition de la production de l'oxyde nitrique par les macrophages (Raw 264.7) d'autre part archivés en présence de la lipopolysaccharide.

a-) Effet des fractions de plantes sur la production de l'oxyde nitrique par les macrophages Raw 264.7 activés

Culture des macrophages Raw 264.7 et traitement avec les fractions de plantes

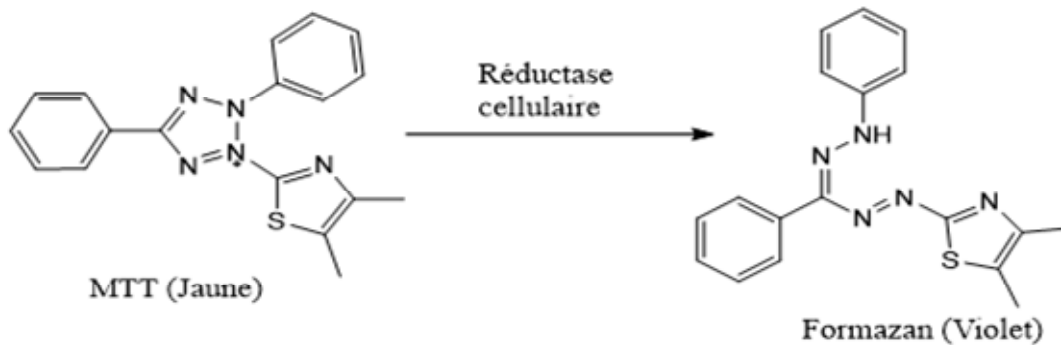
La lignée cellulaire Raw 264.7 des macrophages a été cultivée dans le milieu DMEM contenant la L-glutamine (4,5 g/L et 4 mM) supplémenté avec 10% FCS (serum fetal de veau) et 1% de solution d'antibiotique PSF (penicilline/streptomycine/fungizone). Ces cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur sous une atmosphère de 5% CO₂. Cent microlitres de suspension cellulaire (2×10^6 cellules par mL) ont été introduits dans des plaques de 96 puits et incubées pendant 24h pour permettre l'adhésion au fond des plaques. Après cette incubation, les cellules ont été traitées pendant 24 h avec de la lipopolysaccharide LPS (concentration finale : 1 µg/mL) seule (témoin négatif), LPS+ quercetine un inhibiteur standard de l'oxyde nitrique (NO) (témoin positif) et LPS + fractions de plantes à différentes concentrations (100, 50, 25 et 12.5 µg/mL). Les fractions de plantes ont été préparées dans du DMSO puis diluées dans le milieu de culture pour une concentration finale en DMSO de 0,5 %. Le dosage du NO a été effectué sur le surnageant et la mesure de la viabilité cellulaire sur les cellules.

Mesure de la viabilité cellulaire

Le test au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide) a été utilisé (Mohamed *et al.*, 2014).

Principe

Le principe repose sur l'utilisation d'un sel de térazolium qui est réduit en formazan par les réductases cellulaires (succinate deshydrogénase) des cellules vivantes selon la réaction ci-dessous. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Ce composé insoluble de couleur violette est solubilisé dans du DMSO ou de l'isopropanol et absorbe à 570 nm.



Réaction de réduction du MTT en formazan par la réductase

Mode opératoire

Après enlèvement du surnageant pour le dosage du NO, 200 μ L de milieu de culture DMEM frais et 30 μ L de la solution de MTT (5 mg/mL) ont été immédiatement ajoutés suivi d'une incubation (37°C, 5% CO₂, 4 heures). Le milieu de culture a été ensuite aspiré à l'aide d'une pompe à vide, puis 50 μ L de DMSO (100%) ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan. L'absorbance a été lu à 570 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Synergy, BioTek). Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé par rapport au témoin (Cellules traitées avec du LPS sans extraits) considéré comme 100% de viabilité.

$$\text{Viabilité (\%)} = (\text{Absorbance du groupe test} / \text{Absorbance du groupe témoin}) \times 100$$

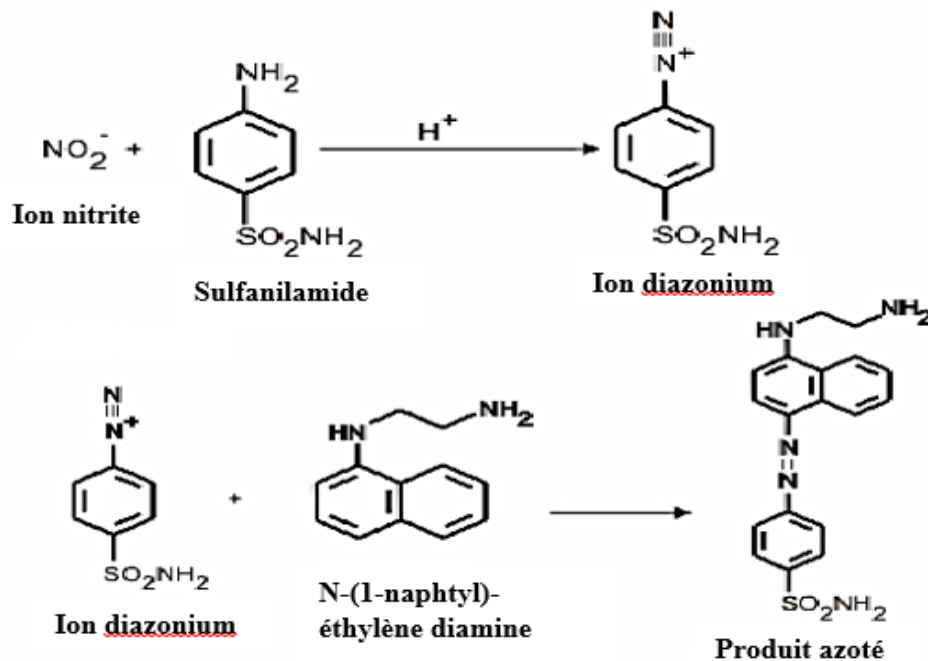
Mesure de la production de l'Oxyde Nitrique (NO)

L'oxyde nitrique libéré par les macrophages a été déterminé en mesurant la concentration en nitrites dans le surnageant de culture cellulaire à l'aide du réactif de Griess par la méthode décrite par **Suga et al. (2009)**.

Principe

Le dosage de l'oxyde nitrique est basé sur la réaction de diazotation qui se produit entre les ions nitrites, la sulfanilamide et le N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochlorure

en condition acide pour former un produit azoté selon la réaction ci-après. Le produit azoté résultant de couleur rouge vif pourpre absorbe à 540 nm.



Réaction de diazotation entre le nitrite, la sulfanilamide et le N-(1- naphthyl) éthylenediamine

Mode opératoire

Après incubation, 100 uL de surnageant de culture de chaque puits ont été transférés dans une nouvelle plaque de microtitration suivi de l'ajout d'un volume égal de réactif de Griess (1% sulfanilamide et 0,1 % naphthyléthylène diamine dihydrochloride dans 2,5% d'acide phosphorique). Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante (25° C) pendant 15 minutes puis l'absorbance a été mesurée à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Synergy Multi-Mode Reader, BioTek). Les concentrations de nitrites ont été déterminées en utilisant l'analyse de régression linéaire à partir d'une courbe d'étalonnage de nitrite de sodium (annexe 1). Le pourcentage d'inhibition de NO a ensuite été calculé sur la base de la capacité des échantillons testés à inhiber la production d'oxyde nitrique par les cellules par rapport au témoin (cellules traitées au LPS sans extraits), considérée comme 0% d'inhibition.

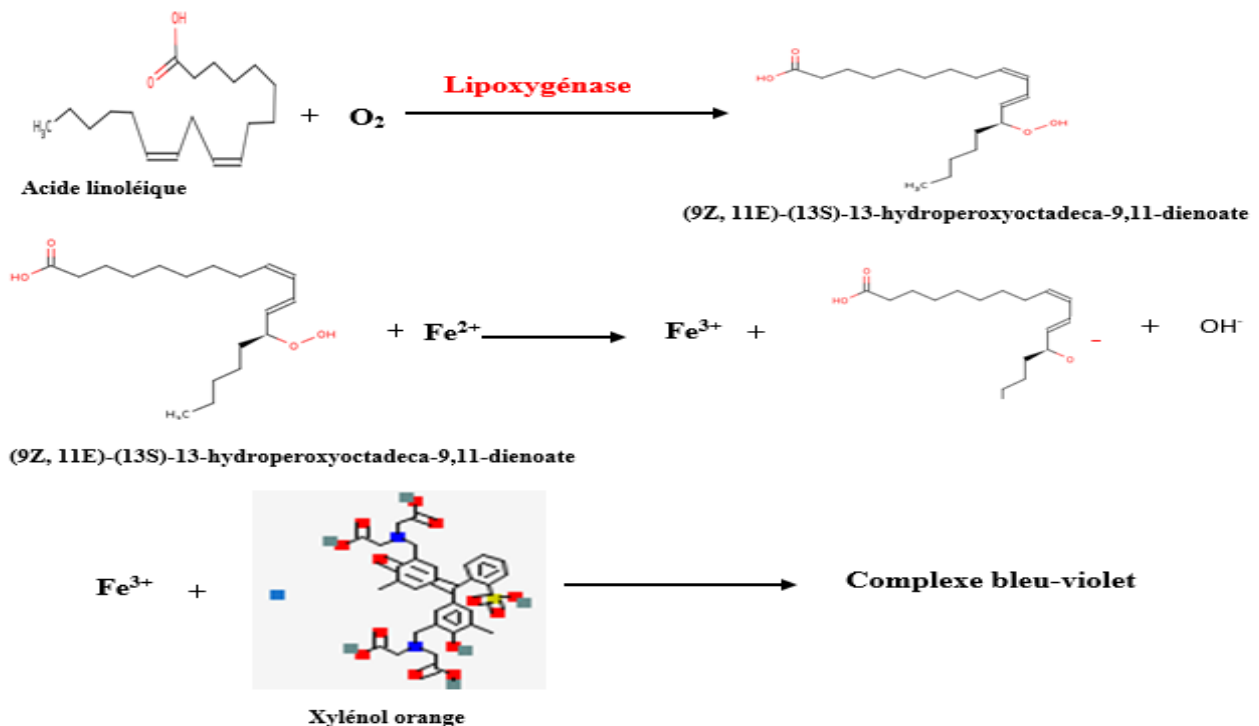
$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Absorbance témoin} - \text{Absorbance essai}}{\text{Absorbance témoin}} \right] \times 100$$

b-) Mesure de l'inhibition de l'activité de la lipoxygénase par les fractions de plantes

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par Jameson *et al.*(2014). La lipoxygénase utilisée est celle du soja (L7395).

Principe

L'hydroperoxyde lipidique formé par action de la lipoxygénase (LOX) sur un acide gras polyinsaturé oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} , lequel oxyde ensuite le xylénol orange [XO ; *o-cresolsulfonaphthalein 3',3'-bis (methylimino) diacetic acid, sodium salt*] pour former un complexe Fe^{3+} /xylénol orange qui absorbe à 560 nm. Les équations des réactions sont les suivantes :



Réaction d'oxydation de l'acide linoléique

Mode opératoire

La 15-lipoxygénase (*Glycine max*) (40 μ L) a été incubé en présence de différentes concentrations (12,5 25, 50, 100 μ g/mL) des fractions de plantes ou la quercétine (témoin positif) à température ambiante pendant 5 minutes. Puis l'acide linoléique (concentration finale 140 μ M) dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) a été ajouté et le mélange incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 20 minutes. La réaction a été arrêtée par ajout de 100 μ L de réactif de FOX [Acide sulfurique (30 mM), xylénol orange (100 μ M), sulfate de fer

(II) (100 µM), méthanol/Eau (9 :1)]. L'absorbance lue à 560 nm après 30 minutes à 25°C. L'inhibition de l'activité de la lipoxigénase par les fractions de plantes a été déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de l'hydro-péroxyde formé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Absorbance témoin} - \text{Absorbance essai}}{\text{Absorbance témoin}} \right] \times 100$$

A l'issue des expériences réalisées précédemment, nous avons sélectionné les fractions hexanique et méthanolique de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum* comme possédant un potentiel anti-âge cutané pour la suite des expériences.

II.2.3- Effet des fractions actives sur les dommages induits par les rayons UVB sur les cellules (NIH/3T3 et B16F10) de la peau de souris

Cette partie a pour but d'avoir une confirmation de l'activité des fractions de plantes actives dans la partie précédente sélectionnées *in vitro* sur des modèles cellulaires.

➤ Préparation des solutions d'extrait actif à tester

Une solution mère d'extrait actif a été préparée dans 0,5 ou 1% de DMSO dans du PBS à une concentration de 1000 µg/mL, qui a ensuite été filtrée à travers une membrane de 0,22 µm. Les concentrations désirées (100, 50, 25, 12,5 µg/mL) ont été préparées par dilution de la solution mère avec du milieu de culture DMEM.

➤ Culture des fibroblastes et des mélanomes

Des cellules de fibroblastes (NIH/3T3) et de mélanomes (B16F10) obtenues du *National Center for Cell Science* (NCCS, Pune, Inde) ont été cultivées dans du DMEM supplémenté par une solution de FBS à 10% et contenant 1% d'antibiotiques antimycotiques puis, incubées à 37°C, pendant 24h en atmosphère humide, 5% CO₂. Toutes les 48h les cellules confluentes étaient détachées en introduisant 1 mL de trypsine-EDTA (0,25% p/v et 0,53 mM) et centrifugées. Le culot cellulaire était par la suite suspendu dans 1 mL de DMEM complet et divisé en deux parties. Une partieensemencée dans les plaques de 96 ou de 6 puits selon l'expérience à réaliser et l'autre partie sub-cultivée ; ce qui constituait un passage. Les groupes ont été constitués comme suit : témoin négatif (cellules non traitées), témoin UV-B (cellules irradiées par UV-B), témoin fraction de plante (cellule non irradiée par UV-B + fraction de plante), groupe test (cellule irradiée par UV-B + extrait de plante), et témoin positif (cellules irradiées aux UV-B + vitamine C).

Les cellules étaient utilisées aux 20^{ème} et 11^{ème} passages respectivement pour les mélanomes et les fibroblastes.

➤ **Mesure de la viabilité cellulaire : Test au MTT.**

La cytotoxicité des fractions de plantes vis-à-vis des fibroblastes NIH/3T3 et mélanomes B16F10 a été déterminée par le test au 2- (2,5-diméthyl-2thiazolyl) -2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT) décrit précédemment. Les cellules ont été cultivées dans des plaques à 96 puits pendant la nuit et exposées à une gamme de concentrations de fractions actives de plantes pendant 24 h. Un échantillon de 100 µL d'une solution mère à 5 mg/mL de MTT a été ajouté à chaque puits. Après 4 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 5% CO₂, les surnageants sans cellules ont été aspirés de chaque puits et les cristaux de formazan violets résultants ont été dissous dans 150 µL de diméthylsulfoxyde. Les plaques ont été doucement agitées pendant 15 minutes à la température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide de lecteurs de microplaques universels ELX800 (Bio-Tek instruments, Inc., Winooski, VT). La viabilité cellulaire à chaque concentration des échantillons testés a été déterminée par comparaison avec un témoin sans fraction de plante.

➤ **Standardization de l'intensité des rayons UVB**

Au préalable une expérience a été effectuée pour standardiser les intensités des rayons UV-B à utiliser sur les cellules.

Principe

Des expériences ont été menées afin de déterminer l'intensité appropriée d'irradiation en rayon UVB, moins toxique pour la cellule et pouvant induire des EOR, induire les gènes tyrosinase (TYR) et la *tyrosinase related protein-1* (TRP-1) dans les mélanomes B16F10; induire les gènes de la matrice métalloprotéinase-1(MMP-1) et réguler à la baisse le procollagène de type 1(COL1A1) dans les fibroblastes NIH/3T3.

Mode opératoire

Les cellules ont été irradiées avec les UVB à différentes intensités. En bref, 5x10⁵cellules ont étéensemencées dans des plaques à six puits dans un milieu de culture complet pendant 24 heures. Avant l'irradiation par les rayons UVB, le milieu de culture a été remplacé par 1 mL de PBS par puits. Les cellules ont été irradiées avec une gamme d'intensité en rayons UVB (6,6, 39,6 et 79,2 mJ/cm² pour B16F10 ; 39,6 et 29,7 mJ/cm² pour NIH/3T3), avec un pic de longueur d'onde d'émission de 312 nm pour l'utilisation d'une lampe UVB (lampes Luchem-UVB) qui délivre une irradiation uniforme à une distance de 15 cm. Les intensités de rayonnement ont été surveillées à l'aide de LZC-4X (Canotek, Canada) comme décrit par (Hong *et al.*, 2015). Après irradiation, les cellules ont été traitées avec un milieu de

culture incomplet pendant 24 h supplémentaires. La cytotoxicité induite par les rayons UVB a été évaluée par comptage au bleu trypan. Pour toutes les expériences, les cellules étaient ensemencées dans des plaques à six puits.

Après standardisation de l'intensité des rayons UV-B, nous avons constaté que les intensités de 39,6 mJ/cm² pour les mélanomes (B16F10) et de 29,7 mJ/cm² pour les fibroblastes (NIH/3T3) obéissaient au changement décrit précédemment dans le principe.

➤ Comptage des cellules au Bleu Trypan (Strober, 2001).

Principe

En présence du bleu trypan, les cellules vivantes déclenchent un mécanisme d'exclusion du colorant qui empêche son internalisation. Elles apparaîtront brillantes au microscope optique contrairement aux cellules mortes qui seront colorées en bleues.

Mode opératoire

Pour réaliser ce test, une solution de Bleu Trypan à 0,4% diluée dans le PBS a été utilisée. Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 100 µL de la suspension cellulaire fraîchement préparée ont été introduits, puis 400 µL de la solution de Bleu Trypan 0,4%. L'ensemble a été mélangé 3 à 4 fois à l'aide d'une micropipette, puis 10 µL de la suspension obtenue ont été prélevés et déposés dans la chambre de *Neubauer* (figure 23). La préparation a été ensuite observée sous microscope optique et les cellules vivantes et mortes ont été comptées à l'aide d'un hémocytomètre.

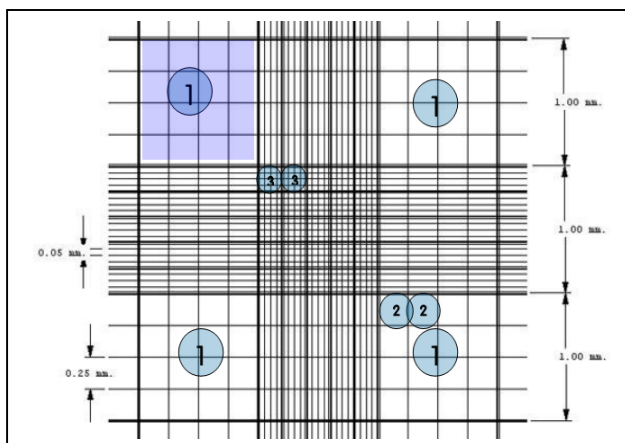


Figure 23 : Chambre de Neubauer (Strober, 2001)

Les cellules ont été comptées dans les quatre carrés qui ont chacun pour superficie $S=1\text{mm} \times 1\text{mm}$ soit 1mm^2 et pour volume : $V=1\text{mm}^2 * 0,1\text{mm}=0,1\text{mm}^3=1 \times 10^{-4}\text{mL}$.

Le calcul de la concentration de la suspension cellulaire de départ a été effectué en utilisant la formule suivante :

$$\left(\frac{\text{Cellules}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Nombre total de cellules dans les 4 carrés} \times 100 \times fd \times 10000}{\text{Nombre de carrés comptés (4)}}$$

Avec : fd = facteur de dilution = 500/100 = 5

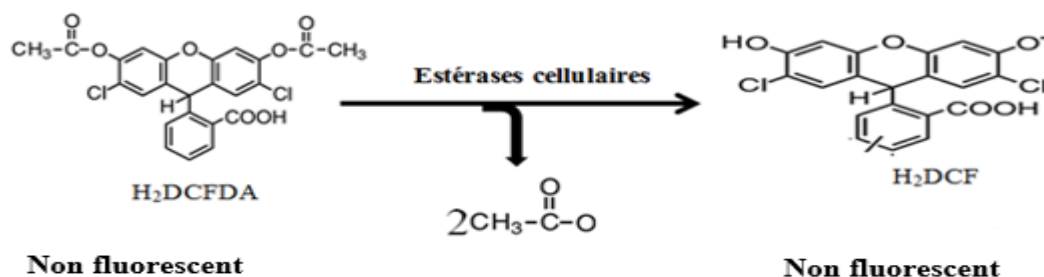
Le pourcentage de viabilité a été ensuite déterminé par la formule ci-dessous.

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules brillantes} \times 100}{\text{Nombre total de cellules}}$$

II.2.3.1- Evaluation de la production intracellulaire des espèces oxygénées réactives induites par les rayons UVB

Principe

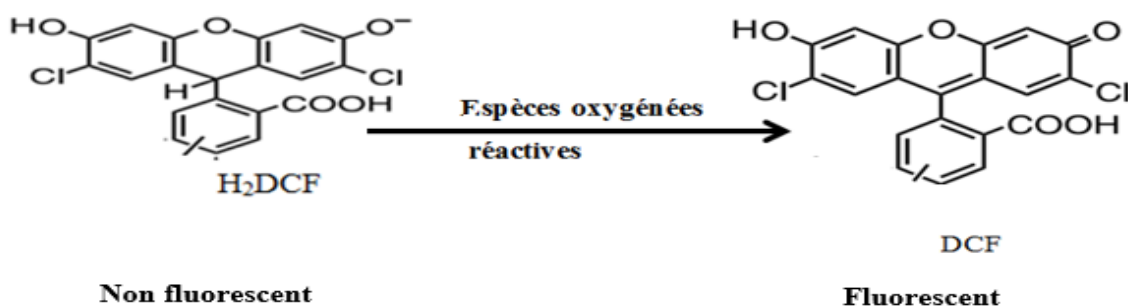
Le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H₂DCFDA) est une molécule capable de pénétrer dans les cellules où elle est déacétylée par les estérases cellulaires pour former un produit non fluorescent, le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine (H₂DCF).



Réaction de déacétylation du H₂DCFDA par les estérases

Le H₂DCF formé est ensuite oxydé par les espèces oxygénées réactives (EOR) pour former le 2',7'-dichlorofluoresceine (DCF) qui, excité à 485 nm, émet une fluorescence à

525 nm dont l'intensité est directement proportionnelle au taux d'EOR dans la cellule.



Réaction d'oxydation du H₂DCF par les EOR

Mode opératoire

La méthode décrite par **Bravo et al., (2017)** a été utilisée. Les cellules ont été cultivées en atmosphère humide, 5% CO₂ à 37° C à raison de 5x10⁵ cellules par puits dans des plaques à 6 puits avec 2000 µL de milieu de culture complet pendant une nuit. Le milieu a été retiré et les cellules ont été traitées avec les fractions pendant 2 h. Ensuite, les cellules ont été irradiées par les UVB d'intensité de 39,6 et 29,7 mJ/cm² pour les cellules B16F10 et NIH/3T3 respectivement pendant 60 et 45 secondes. Après irradiation, elles ont été incubées à 37° C pendant 15 min. Pour détecter la production intracellulaire des EOR, une solution de H₂DCFDA (25 µM) a été ajoutée aux cellules qui ont été incubées pendant 15 min supplémentaires à 37° C dans un incubateur à CO₂. Enfin, le milieu a été aspiré et les cellules ont été lavées deux fois avec 500 µL du PBS. La fluorescence a été observée à l'aide d'une station d'imagerie à cellules fluides (Life Technologies, USA). L'intensité de la fluorescence a été normalisée à l'aide du logiciel image J.

II.2.3.2- Elimination des fractions actives mimant l'action des rayons UVB

Afin d'évaluer l'effet des fractions de plantes en présence des rayons UVB, les fractions ayant un effet similaire aux rayons UVB sur les cellules ont été éliminées. A cet effet, les cellules ont été traitées par différentes fractions actives de plantes aux concentrations non toxiques : 12,5, 25, 50 et 100 µg/mL. Les gènes cibles ont été analysés par la technique de *polymerase chain reaction* (RT-PCR). Les fractions de plantes qui ont entraîné une expression des gènes de façon similaire à l'action des UVB ont été éliminées : c'est-à-dire celle qui ont induit les gènes de tyrosinase (TYR) et la *tyrosinase related protein-1* (TRP-1)

dans les mélanomes B16F10 ; induit le gène de la matrice métalloprotéinase-1(MMP-1) et régulé à la baisse le gène du procollagène de type 1(COL1A1) dans les fibroblastes NIH/3T3.

II.2.3.3- Analyse de l'expression des gènes cibles par *Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR)

La RT-PCR a été utilisée pour évaluer l'effet des fractions sur l'expression de quelques gènes antioxydants, de biosynthèse du collagène et de la mélanine. Il s'agit de : *Nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf-2) ; Hème oxygénase-1 (HO-1); procollagène de type I (COL1A1); matrice métalloprotéinase-1 (MMP-1); Tyrosinase (TYR) et *Tyrosinase Related Protein-1* (TRP-1). Le Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé comme gène témoin interne.

➤ Définition

La RT-PCR est une technique d'analyse d'expression des gènes basée sur l'amplification d'un ADNc à l'aide d'amorces spécifiques.

➤ Traitement des cellules

Des cellules (5×10^5 par puit) ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits avec un milieu de culture complet frais pendant 24 heures. Les cellules ont été prétraitées en remplaçant le milieu de culture par 1 mL de milieu frais contenant les différentes concentrations de fraction de plante pendant 2 h, puis exposées aux rayons UVB comme décrit au paragraphe précédent, et incubées pendant 24 h supplémentaires. Les ARN totaux ont ensuite été isolés, purifiés, convertis en cDNA et analysés par *Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR).

➤ Isolement et purification des ARN totaux

Les ARN totaux ont été isolés des cellules à l'aide du réactif de TRIzol (Ambion, Life Technologies, Darmstadt, Germany) en suivant les instructions du fabricant. Après traitement, les cellules ont été lavées une fois avec 500 µL de PBS. Ensuite, 750 µL du réactif de TRIzol ont été ajoutés. Les suspensions cellules ont été transférées dans des eppendorfs exempt de RNase de 1,5 mL et homogénéisées par 15 inversions des eppendorfs. Cent cinquante microlitres de chloroforme ont été ajoutés dans les tubes et ceux-ci ont été agités vigoureusement à l'aide du vortex pendant 15 secondes et les tubes ont été centrifugés (12 000 g, 15 min, 4°C). Trois phases ont été observées : une phase aqueuse claire supérieure qui contient les ARN; une interphase qui contient l'ADN, et une phase organique inférieure

qui contient les protéines. La phase aqueuse claire supérieure contenant les ARN a été prélevée (400 μL) et transférée dans de nouveaux tubes Eppendorf exempt de RNase et les ARN précipités par ajout de 375 μL d'isopropanol. Après 20 min d'incubation à température ambiante, le culot d'ARN a été obtenu par centrifugation (12 000g, 10 min, 4°C). Ensuite, les ARN ont été lavés par suspension dans 750 μL d'éthanol (75% v/v) suivi d'une centrifugation (7 500g, 5 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé et le culot d'ARN a été séché à l'air pendant 20 min. Finalement, le culot d'ARN a été suspendu dans 25 μL d'eau exempte de RNase (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo, USA) et incubé à 55°C dans un block chauffant pendant 5 min. Après toutes ces opérations, les ARN totaux obtenus étaient prêts pour les analyses ultérieures.

La concentration et la pureté des ARN obtenus ont été déterminées en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm à l'aide du spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*). Le rapport des absorbances 260/280 de tous nos échantillons d'ARN variait entre 1,8-2,1. Ces valeurs indiquent que les ARN étaient purs. De même, l'intégrité des ARN a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour cela, 2,5 μL d'échantillon d'ARN ont été mélangés à 0,5 μL de tampon de charge *5X loading buffer* (Takara, Japon) et déposés dans les puits du gel d'agarose à 1% préparé avec le tampon de migration TAE (tampon Tris/Acétate 40 mM, EDTA 1mM, pH 8) contenant du bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nécessaire pour la révélation des bandes d'ARN. La migration a été effectuée sous un courant de tension 100 V pendant 20 min. Le gel a été visualisé sous un trans-illuminateur UV en utilisant l'appareil *Bio-Rad Trans-illuminator*. L'obtention d'une bande d'ARN après migration indique que les ARN totaux extraits étaient intacts et pouvaient être utilisés pour la RT-PCR. Mais avant, ils ont été convertis en ADNc.

➤ **Synthèse des ADNc par reverse transcription**

Les ADNc ont été synthétisés dans un thermo-cycler (*Eastwin, Life Science*) en utilisant *iScript cDNA Synthesis kit* en respectant les instructions du fabricant. Dans un tube de micro-centrifugation RNase-free, on ajoute 4 μL du mélange réactionnel (amorces d'oligoDT, du tampon de réaction, dNTP et Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor), 1 μL de transcriptase reverse M-MLV-RT, 1 μg d'ARN et l'eau RNase-free pour compléter le volume final réactionnel à 20 μL . L'extension s'est déroulée à 42°C pendant 60 min suivi de la dénaturation de la transcriptase reverse M-MLV-RT à 90°C pendant 5 min. Les ADNc

obtenus ont été contrôlés par une réaction de PCR en utilisant les amorces du gène du témoin interne (GAPDH) et, par la suite conservés à -20°C puis soumis à la quantification par RT-PCR pour la mesure de l'expression des gènes cibles.

➤ **Amplification des ADNc par PCR semi-quantitative**

La PCR semi-quantitative a été réalisée dans un *thermo-cycler Applied Biosystems 7500 System* (Bio-RAD Laboratories, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant. Le volume réactionnel était constitué ainsi qu'il suit : 1 µL d'ADNc, 6,25 µL de Dream Tag, 0,5 µL (25 µM) de chaque amorce (sens 5'-3' et anti-sens 3'-5') et 4,25 µL d'eau RNase-free. La RT-PCR a débuté par une dénaturation initiale de l'ADNc et l'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 3 min, suivi de 29 cycles. Les paramètres du cycle étaient les suivants : dénaturation de l'ADN à 95°C (30 secondes), hybridation avec les oligonucléotides (amorces) à 55-60°C pendant (30 secondes) et l'élongation du fragment d'ADN à amplifier à 72°C (60 secondes). Les 29 cycles ont été suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 5 min. Pour la suite, 11,5 µL des ADN obtenus et 2,5 µL de marqueurs de poids moléculaire compris entre 100 et 1000 paires de bases ont été déposés dans les puits du gel d'agarose à 1,2% préparé avec le tampon de migration TAE 50X (tampon Tris/Acétate 40 mM, EDTA 1mM, pH 8) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) nécessaire pour la révélation des bandes. La migration a été effectuée sous un courant de tension 100 V pendant 1h 30 min. Le gel a été visualisé (GelRed est utilisé pour la visualisation) sous un trans-illuminateur, photographié et enregistré (Biometr UV/doc).

➤ **Calcul de l'expression des gènes cibles**

Les intensités des bandes obtenues ont été quantifiées à l'aide du logiciel image J. Le rapport intensité du gène d'intérêt/intensité de la bande du gène témoin interne (GAPDH) permet de mettre en évidence l'effet des fractions sur l'expression du gène. Les amorces de tous les gènes d'intérêts ont été synthétisées par la compagnie TSINGKE *Biological Technology Company* (Beijing, China). Leurs séquences sont présentées dans le tableau IV ci-dessous.

Les couples d'amorces (tableau IV) ont été constitués et sélectionnés selon plusieurs critères : la taille du fragment amplifié (inférieure à 250 pb) ainsi que l'absence de formation d'homo ou d'hétérodimères d'amorces et de boucles intramoléculaires (vérifiée grâce au

logiciel Oligo CaculatorV2 et Thermofischer Scientifique Primer Analyse). La spécificité des amorces vis-à-vis de la séquence de l'ADN complémentaire cible a été également vérifiée à l'aide du logiciel BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) qui permet de tester l'alignement des amorces avec l'ensemble des séquences répertoriées chez les souris.

Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour la PCR Semi-quantitative.

Gènes	Numéro d'Accession	Amorces Sens (5'-3')	Amorces Anti-sens (5'-3')	Longueur du Produits
COL1A1	NM_007742.4	CCAGTGGCGGTTATGACT	GCTGCGGATGTTCTCAAT	167
MMP-1	NM_032006.3	TTGGAGCAGGCAGGAAGGA	TGTCTCCACATTTTGCCGGT	148
TYR	D00131.1	CCATGACAAAGCCAAAACCCC	CCTTCGCAGCCATTGTGTTC	159
TRP-1	NM_00128205.1	TTCATCTGAGCACCCCTGTC	AGGGGGAGGACGTTGTAAGA	104
NRF2	NM_010902.4	AAGAATAAAGTCGCCGCCCA	AGATACAAGGTGCTGAGCCG	170
HO-1	NM_010442.2	GAATCGAGCAGAACCAGCCT	CTCAGCATTCTCGGCTTGG	135
GAPDH	NM_017008.4	GTCGGTGTGAACGGATTGG	AGATGCCTGCTCCCATTCT	192

COL1A1, procollagen type I; MMP-1, matrice metalloproteinase-1; TYR, Tyrosinase; TRP-1, Tyrosinase Related Protein-1; NRF-2, Nuclear factor E2-related factor 2; HO-1, Heme oxygenase-1; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase.

II.2.3.4. Effet des fractions actives sur la production de la mélanine par les cellules B16F10 après irradiation par les rayons UVB

Le taux de mélanine a été mesuré en utilisant la méthode décrite précédemment par **Lee et al. (2017)** avec de légères modifications. Ensuite, l'effet des fractions actives sur la production de la mélanine a été mesuré comme suit :

Les cellules B16F10 ont été cultivées jusqu'à 75% de confluence dans des plaques de 6 puits. Les cellules ont été prétraitées avec les fractions de plantes pendant 2 h. Puis celles-ci ont été exposées aux rayons UVB à un pic de longueur d'onde de 312 nm et incubées pendant 24 heures supplémentaires. Après lavage avec du PBS, les cellules ont été détachées à l'aide de trypsine dissoute dans 90 µL de solution de NaOH 1 N contenant du DMSO (5%) et incubées à 60°C pendant 1 h. La teneur en mélanine a été déterminée en mesurant l'absorbance à 405 nm (**Lee et al., 2017**) et calculée selon la formule ci-après :

$$\text{Teneur en mélanine} = [(\text{DO témoin} - \text{DO essai}) / \text{DO témoin}] \times 100$$

A l'issue des expériences réalisées plus haut, les fractions de plantes qui protégeront les cellules des peaux de souris des dommages induits par les rayons UVB, en inhibant la

dégradation du collagène dans les fibroblastes et en réduisant la mélanine synthétisé dans les mélanomes, feront l'objet des analyses afin de déterminer les composés constitutifs. En plus, les activités anti-inflammatoires, anti-tyrosinase et anti-élastase des composés isolés seront étudiées.

II.2.4- Détermination du profil phytochimique et effet anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase de quelques composés isolés des fractions actives

II.2.4.1. Analyse du profil chimique des composés des fractions actives

a-) Mise en évidence des composés chimiques présents dans les fractions actives de plantes

Afin d'avoir une idée sur la composition phytochimique de fractions actives, quelques groupes des composés ont été mis en évidence au moyen des tests colorimétrique utilisés généralement dans la littérature (**Harborne, 1980; Odebiyi and Sofowora, 1979**):

Test des triterpènes et stérols test de Liebermann-Burchard

Une masse de 0,5 mg de fractions a été dissoute dans du méthanol. A ce mélange, nous avons ajouté 0,5 mL d'anhydride acétique, puis 0,5 mL de H₂SO₄ concentré. La présence des triterpènes et des stérols s'est manifestée par l'apparition de la couleur bleu verdâtre.

Test des flavonoïdes

Dans une solution contenant 0,5 mg de fraction de plante dissoute dans du méthanol, nous avons ajouté quelques gouttes de HCl et quelques grains de copeau de magnésium. La présence des flavonoïdes s'est traduite par une effervescence avec changement de coloration (bleu au rouge brique).

Test des polyphénols

Dans une solution contenant 0,5 mg de fraction de plante dissoute dans du méthanol et chauffée pendant 5 min, nous avons ajouté 3 gouttes d'une solution de cyanure ferrique fraîchement préparé (1 mL de FeCl₃ 1% et 1 mL de K₃Fe(CN)). L'apparition d'une coloration bleu-vert a marqué la présence de polyphénols.

Test des alcaloïdes

Après avoir dissout 0,5 mg de fractions de plante dans le méthanol, nous y avons ajouté quelques gouttes de HCl et quelques gouttes du réactif de Meyer. La formation d'un précipité jaune a indiqué la présence des alcaloïdes.

Test des Coumarines

Une masse de 0,5 mg de fraction de plante dissoute dans 02 mL de la solution éthanolique a été réparti dans 2 tubes à essai. Dans un des tubes à essai, a été ajouté 0,5 mL de NaOH 10%, puis les 2 tubes à essai ont été chauffés au bain-marie jusqu'à ébullition. Après refroidissement, nous avons observé les tubes à la lampe UV à 365 nm. L'absence de fluorescence jaune dans les 2 tubes indique un test négatif.

Test des quinones

Après avoir agité énergiquement un mélange de 0,5 mg de fraction de plante et de 2 mL d'hydroxyde de sodium 10M, l'apparition rapide ou lente d'une coloration rouge orange indique la présence des quinones.

Test des saponines

Nous avons introduit dans un tube à essai quelques gouttes de solution contenant 0,5 mg de fraction dissoute au méthanol. Ensuite, nous y avons ajouté un petit volume d'eau distillée (2ml). L'ensemble a été agité pendant 15 secondes. La formation de la mousse a indiqué la présence des saponines.

Test des tanins

Dans une solution de 0,5 mg de fraction dissoute au méthanol, on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique. La présence des tanins se traduit par un changement de la coloration de la solution. La couleur bleue foncée justifie la présence des tanins galliques tandis que la couleur vert noirâtre montre celle des tanins catéchiques.

Test des leucoanthocyanes

A Une masse de 0,5 mg de fraction dissoute au méthanol, nous avons ajouté 0,5 mL du HCl 2 N et nous avons chauffé le mélange pendant 3 min. la présence des leucoanthocyanes a été révélée par l'apparition de la couleur rouge à violette.

b-) Analyse des composés présents dans les fractions actives par Chromatographie en phase Liquide à Haute Pression couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Afin de déterminer les différents composés des fractions actives et leurs structures, la chromatographie liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au Centre Interdepartementale Grandi Strumenti (CIGS), Université de Modena et Reggio Emilia, Italie.

Principe

La CLHP est une technique chromatographique utilisée pour séparer un mélange de composés en vue de l'identification, de la quantification ou de la purification des composants individuels d'un mélange. Elle est basée sur la pression exercée par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Après injection, le mélange à séparer se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. En fonction de la phase stationnaire, les composants du mélange sont inégalement retenus lors de la traversée dans la colonne. De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les composants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Le détecteur placé à la sortie de la colonne, couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. Le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté) caractérise qualitativement chaque composant. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque composé dans le mélange injecté. La spectrométrie de masse quant à elle est une technique très puissante et sensible pour déterminer les structures des composés en analysant le rapport m/z .

Mode opératoire

Deux milligrammes de chaque fraction de plante ont été dissouts dans 1 mL d'acétonitrile et filtrés à l'aide du filtre PTFE, puis la solution a été agitée au vortex pendant 20 secondes et centrifugée à 5000 trs/min. pendant 5 minutes et enfin 5 μ L du surnageant ont été injectés dans l'appareil HPLC. Le système UHPLC 3000 Series (Thermo Scientific Dionex Ultimate) équipé d'une pompe quaternaire (Series RS), et d'un échantillonneur automatique WPS-3000RS Series (Thermo Fisher Scientific Ultimate) controlé par le logiciel Chromeleon 7,2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA and Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific, Germany) et relié à un spectromètre de masse de

haute résolution (Q Exactive™ Thermo, Bremen, Germany) a été utilisé pour nos analyses. Le spectromètre de masse a été au préalable calibré au début de l'analyse. L'azote (pureté > 99,999%), obtenu à partir d'un générateur d'azote Zefiro zero 60 LC-MS (CINEL, Vigonza, Italie), a été utilisé à la fois comme source de gaz et de collision. Le système chromatographique a été couplé à la SM avec une source d'ionisation chauffée par électrospray II (HESI II) opérant en mode négatif et positif avec des méthodes analytiques séparées. La sonde a été chauffée à 290 °C, puis la température capillaire a été réglée à 270 °C et les flux suivants d'azote ont été utilisés pour l'ionisation : Sheat Gas 40, Aux Gas 30, Sweep Gas 3. La tension capillaire a été réglée à -3,5 et 3 kV pour le mode négatif et positif respectivement et le niveau RF de la lentille S a été fixé à 45 (unités arbitraires). La colonne de haute résolution (HT 2,1 i.d. x 50mm Zorbax SB-C18 with 1,8µ particle size) provenant de Agilent Technologies (USA) a été maintenue à 25°C et l'élution a été faite en utilisant une phase mobile constituée de l'eau distillée 80% + 0,1% acide formique (A) et de l'acétonitrile 20% (B) avec le débit de 0,3 mL / min: Le gradient suivant a été utilisé lors de l'élution: de 0,1 à 10%B pendant 1 minute, puis 20 à 98%B et enfin B% a été maintenu stable pendant 8,8 minutes, avant l'étape de reconditionnement, pour une durée totale de 25 minutes.

Des spectres MS centrifugés ont été enregistrés de 100 à 1000 m/z, à des résolutions de 70000 et 17500, respectivement. Les chromatogrammes et les temps de rétention des composés ont été enregistrés. Les trois ions les plus intenses ont été sélectionnés pour la dissociation induite par collision favorisée par l'azote de MS (CE étagée = 20, 28). Une exclusion active du précurseur de 6 secondes a été définie. En parallèle, une expérience de fragmentation entièrement ionique (CE=28) a été programmée pour des analyses post-hoc. L'étalonnage de masse d'Orbitrap a été effectué chaque semaine, en mode négatif et positif, afin d'assurer une précision de masse de ≤ 2 ppm. Les logiciels XCalibur 2.9 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) et FreeStyle (v. 1.3, Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) ont été utilisés pour le contrôle UHPLC et le traitement des données, respectivement.

c-) Isolement bio guidé des composés

Au paragraphe II.2.2, les fractions de plantes ont été testées pour leurs activités anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase puis, les fractions actives ont été sélectionnées. La fraction hexanique de PA (PAH) a présenté les bonnes activités par rapport aux autres

fractions actives de plantes. Certains composés constitutifs de cette fraction ont été isolés et, les activités anti-inflammatoires, anti-tyrosinase et anti-élastase des composés isolés retestés.

✓ Extraction et isolement des composés

Les écorces de *P. aurantiacum* ont été séchées puis broyées pour donner 2,250 kg de poudre. Celle – ci a été extraite par macération à froid dans le mélange CH₂Cl₂-MeOH (1:1) pendant 48 heures. Après filtration, la solution résultante a été concentrée par évaporation du solvant sous pression réduite pour donner 587,7 g d'extrait brut d'aspect noirâtre et visqueux. De cet extrait, nous avons, à l'aide des techniques chromatographiques (chromatographie sur couche mince et chromatographie sur colonne), isolé vingt sept composés indexés de A à Z (voir figure 24 ci-après).

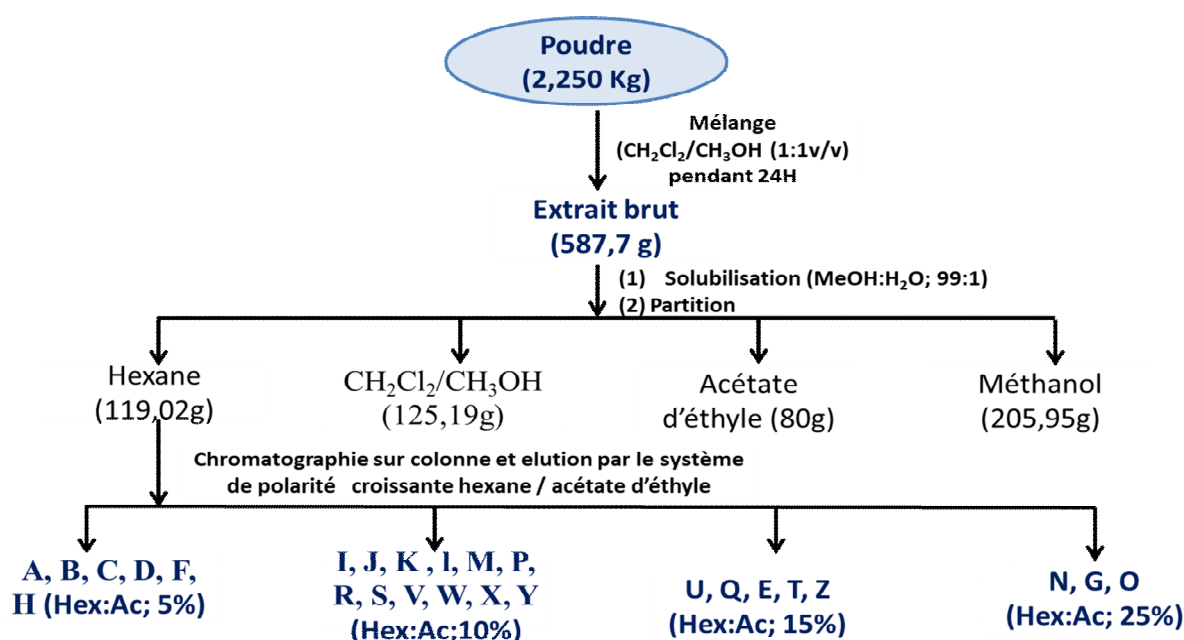


Figure 24 : Protocole d'extraction et d'isolement des composés

A,B,C,D,F,G,H,I,J,K,L,P,Q,R; mélange de la 3-géranyloxyémodinanthrone et de la 3-géranyloxyémidine, N; mélange de 3-géranyloxyémodinanthrone et d'un triterpène, V; mélange du lupéole et d'un autre triterpène, O, T; mélange de xanthone et d'alcool d'acide gras, U; mélange complexe d'antraquinone et Z; mélange de xanthone triterpène et anthraquinone.

✓ Résonance magnétique nucléaire (RMN) des composés isolés

Principe

La RMN est la méthode de choix pour l'identification des composés isolés. Elle est basée sur le fait que les atomes d'hydrogène et de carbone peuvent, dans un champ magnétique intense, émettre un signal qui dépend de leur voisinage. Placés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent par rapport à celui-ci certaines orientations bien définies auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts. Bref, le spectre RMN d'une

molécule permet de connaître le nombre d'hydrogène de cette molécule et la nature électronique du voisinage de ces hydrogènes (sur un cycle aromatique, sur une chaîne carbone, sur un atome d'oxygène).

Mode opératoire

Cette expérience a été réalisée dans le laboratoire de Chimie Organique et de Substances Naturelles, du Département de Chimie, Université de Kumamoto, Japon.

II.2.4.2 Détermination des propriétés anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase de quelques composés isolés des fractions actives

Les composés isolés de la fraction PAH ont été analysés par amarrage moléculaire puis l'activité a été confirmée *in vitro* afin de savoir si ces composés sont le support d'activités de ladite fraction.

II.2.4.2.1- Effets des composés sur l'activité de l'élastase et de la 15-lipoxygénase

a-) Approche par amarrage moléculaire (*docking moléculaire*)

Principe

Le docking moléculaire est basé sur la recherche des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur. Ce qui permet de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules au moyen des logiciels.

Mode opératoire

Préparation virtuelle des enzymes élastase et 15-lipoxygénase

- Téléchargement des cibles biologiques et analyse des séquences d'acides aminés constitutives (enzymes et facteurs de transcription). Ceci a été possible à partir des bases de données *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org>) et *Uniprot* (<https://www.uniprot.org/uniprot/>).
- Élimination des molécules d'eau

Après le téléchargement de la cible (PDB), nous utilisons un logiciel de visualisation pour voir avec quels ligands l'enzyme est Co-cristallisé (eau, ligands, ion) afin de les éliminer. Ici les molécules d'eau ont été éliminées.

Préparation virtuelle des composés purs isolés (ligands)

La deuxième étape concerne les structures du (ou des) ligand(s) utilisé(s) lors du *docking moléculaire*. Ils sont téléchargés sous forme tridimensionnelle dans les bases de données tel que Pub Chem; (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Docking moléculaire proprement dit

La protéine est considérée comme un corps rigide, la flexibilité du ligand seule est prise en compte pour l'obtention de complexes. L'énergie de liaison du complexe formé est calculée selon la formule ci-après par le logiciel autodock Vina 4.2. Les interactions sont visualisées par le logiciel Ligt+(Chaurasiya *et al.*, 2016; Laskowski et Swindells, 2011).

$$\Delta G \text{ de liaison} = E \text{ du complexe} - E \text{ de la protéine} - E \text{ du ligand}$$

b-) Approche par évaluation des activités au moyens des tests biochimiques

Les activités anti-élastase, anti-15-lipoxygénase, anti-tyrosinase et l'inhibition de l'oxyde nitrique produit par les macrophages activés des composés isolés de la fraction PAH ont été évaluées *in vitro* par les méthodes décrites précédemment.

II.2.5- Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées en triplicat et les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écarts-type (ET). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad InStat 3.0 ou GraphPad prism 6.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Le test de Kolmogorov a été utilisé pour vérifier la normalité des valeurs. Les comparaisons des moyennes ont été effectuées entre les groupes traités et les groupes non traités. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Le seuil de probabilité $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement différent.

**CHAPITRE III : RESULTATS ET
DISCUSSION**

III. Résultats

III.1- Rendement de fractionnement des extraits bruts de plante

Au terme des fractionnements, les fractions ont été pesées et les rendements de fractionnement calculés en rapportant la masse de chaque fraction obtenue à celle de l'extrait brut. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau V ci-dessous. Il en ressort que le rendement de fractionnement varie en fonction du solvant utilisé. La fraction méthanolique a présenté le meilleur rendement.

Tableau V : Rendements de fractionnement des extraits bruts de plantes.

Extraits bruts /Rendements	Fractions	Rendements relatifs à l'extrait brut (%)	Rendements relatifs à la poudre (%)
HMB (18,02%)	HMH	12,15	2,19
	HMC	21,99	3,96
	HMA	30,53	5,50
	HMM	38,84	7,00
PAB (15,8%)	PAH	17,77	2,74
	PAC	18,44	2,91
	PAA	13,16	2,08
	PAM	33,60	5,31
PABf (12,00%)	PAHf	10,32	1,24
	PACf	10,92	1,31
	PAAf	11,48	1,38
	PAMf	42,48	5,10

HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol.

III.2- Determination des fractions actives de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* possédant les activités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-elastase et anti-tyrosinase

III.2.1- Activité antioxydante des différentes fractions de plantes

L'activité antioxydante a été évaluée en déterminant : les pouvoirs réducteur, antiradicalaire des fractions de plantes. Pour chaque test, les valeurs obtenues ont été les suivantes.

✓ Pouvoir réducteur des différents extraits de plantes

La réduction du Fe^{3+} a été effective comme le témoigne la vitamine C. La fraction hexanique d'HM à une concentration de 100 $\mu g/mL$ a montré une capacité de réduction ($0,350 \pm 0,024$) supérieure à celle de la vitamine C ($0,290 \pm 0,009$) comme indiqué dans le tableau VI.

Tableau VI : Pouvoir réducteur des fractions de plantes

Plantes médicinales	Fractions	Pouvoir réducteur (Absorbance à 700nm)
<i>Harungana madascariensis</i>	HMH	0,35+0,01
	HMC	0,28+0,02
	HMA	0,32 \pm 0,01
	HMM	0,26 \pm 0,01
	HMB	0,305 \pm 0,01
<i>Psorospernum aurantiacum</i> écorces	PAH	0,24 \pm 0,01
	PAC	0,22 \pm 0,01
	PAA	0,26 \pm 0,01
	PAM	0,29 \pm 0,01
	PAB	0,28 \pm 0,01
<i>Psorospernum aurantiacum</i> feuilles	PAHf	0,16 \pm 0,02
	PACf	0,255 \pm 0,01
	PAAf	0,27 \pm 0,01
	PAMf	0,28 \pm 0,01
	PABf	0,22 \pm 0,01
Vit C	/	0,29 \pm 0,01

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart- type (n=3). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol.; VITC: Vitamine C.

✓ Pouvoir antiradicalaire des différentes fractions de plantes

La capacité des fractions à piéger le radical DPPH• exprimée en pourcentage est résumée dans la figure 25 ci-dessous. D'une manière générale, le pourcentage de piégeage du radical DPPH augmente avec la concentration en fractions. Le pourcentage de piégeage de toutes les fractions est supérieur à 50% à 100 µg/mL. Six fractions de plantes ont été les plus efficaces avec une CE₅₀ comparable à celle de la vitamine C. La fraction méthanolique de PA a présenté l'activité de piégeage de radicaux DPPH la plus élevée avec un pouvoir antiradicalaire de $22,29 \cdot 10^{-9} \pm 0,05$ mol de DPPH/µg d'extrait par rapport à la vitamine C dont l'activité est de $13,61 \cdot 10^{-9} \pm 0,25$ mol de DPPH/µg d'extrait. Les valeurs des CE₅₀, CP₅₀ et des PA sont regroupées dans le tableauVII suivant.

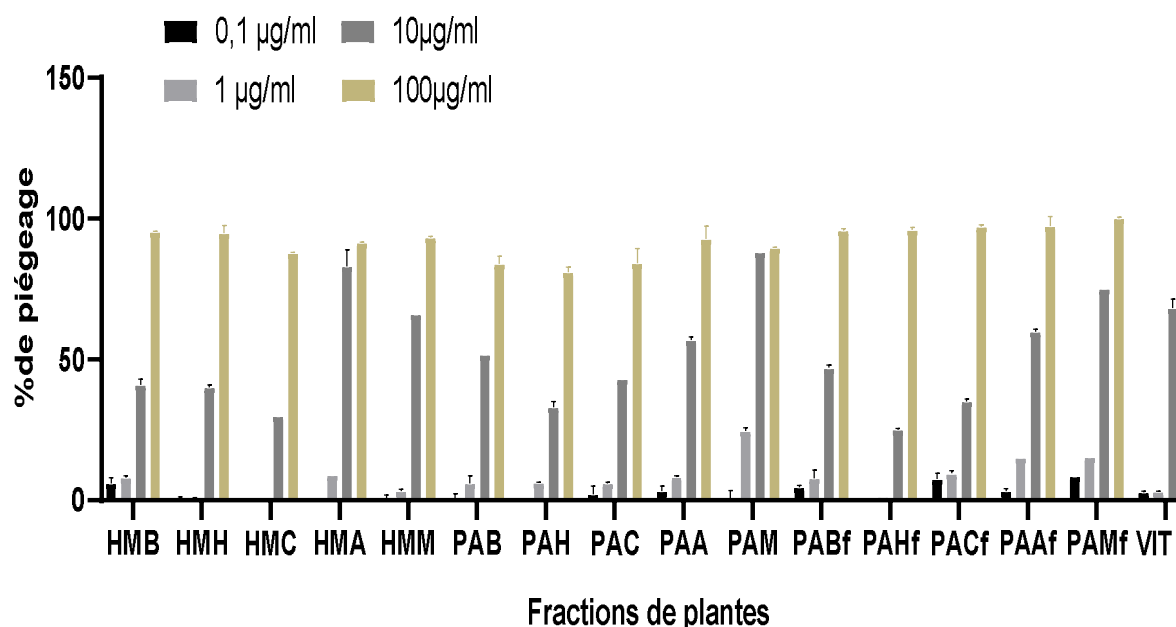


Figure 25 : Piégeage du DPPH par les fractions de plantes à différentes concentrations.

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type (n=3). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol.; VITC: Vitamine C.

Tableau VII : Valeurs de CE₅₀, CP₅₀ et PA des fractions de plantes pour le piégeage du DPPH.

Fractions	CP ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg d'extrait /mol DPPH) 10 ⁹	PA (mol DPPH/µg d'extrait) 10 ⁻⁹
PAM	4,55 ± 0,05 ^a	0,045 ± 0,05 ^a	22,29 ± 0,05 ^a
PAMf	6,20 ± 0,10 ^{ab}	0,061 ± 0,10 ^{ab}	16,36 ± 0,10 ^{ab}
HMA	6,05 ± 0,35 ^{ab}	0,06 ± 0,35 ^{ab}	16,76 ± 0,35 ^{ab}
VIT C	7,45 ± 0,25 ^{ab}	0,73 ± 0,25 ^{ab}	13,61 ± 0,25 ^{ab}
HMM	7,65 ± 0,05 ^{ab}	0,075 ± 0,05 ^{ab}	13,26 ± 0,05 ^{ab}
PAAf	8,00 ± 0,10 ^{ab}	0,079 ± 0,10 ^{ab}	12,68 ± 0,10 ^{ab}
PAA	8,65 ± 0,15 ^{ab}	0,85 ± 0,15 ^{ab}	11,72 ± 0,15 ^{ab}
PAB	9,80 ± 0,10 ^{ab}	0,097 ± 0,10 ^{ab}	10,35 ± 0,10 ^{ab}
PABf	15,35 ± 5,45 ^{bc}	0,151 ± 5,45 ^{bc}	6,61 ± 5,45 ^{bc}
HMB	23,85 ± 2,35 ^{cd}	0,23 ± 2,35 ^{cd}	4,25 ± 2,35 ^{cd}
PAC	25,30 ± 2,50 ^{cd}	0,25 ± 2,50 ^{cd}	4,01 ± 2,50 ^{cd}
HMH	25,85 ± 0,55 ^d	0,25 ± 0,55 ^d	3,92 ± 0,55 ^d
PACf	30,75 ± 0,55 ^d	0,30 ± 0,55 ^d	3,30 ± 0,55 ^d
HMC	41,00 ± 0,60 ^e	0,40 ± 0,60 ^e	2,47 ± 0,60 ^e
PAH	41,55 ± 3,25 ^e	0,41 ± 3,25 ^e	2,44 ± 3,25 ^e
PAHf	41,15 ± 0,05 ^e	0,41 ± 0,05 ^e	2,46 ± 0,05 ^e

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3). Sur une même colonne, les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes (p<0,05). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; VITC: Vitamine C; CP₅₀: concentration nécessaire pour le piégeage de 50% des radicaux; CE₅₀: concentration efficace pour neutraliser 50% des radicaux DPPH ; PA: pouvoir antiradicalaire.

III.2.2- Activités anti-inflammatoires

✓ Inhibition de la production du NO

Le pourcentage de viabilité des cellules RAW 264,7 à 100 µg/mL variait considérablement entre 60% et 96% (figure 26). L'activité inhibitrice de NO de fractions isolées a été évaluée sur les macrophages RAW 264,7 activées par LPS. Les niveaux de nitrites dans les cellules stimulées par le LPS ont augmenté par rapport aux cellules témoins, les quantités en nitrite produites en présence des différentes fractions à 100 µg/mL sont représentées dans la figure 27. Toutes les fractions ont inhibé la production de NO de manière concentration-dépendante (figure 28). Seule la fraction hexane de HM a inhibé de manière significative ($p < 0,05$) la production de NO avec une concentration inhibitrice (IC_{50}) de $65,55 \pm 0,25$ µg/mL par rapport à la quercétine ($15,13 \pm 0,25$ µg/mL), comme le montre le tableau VIII ci-après.

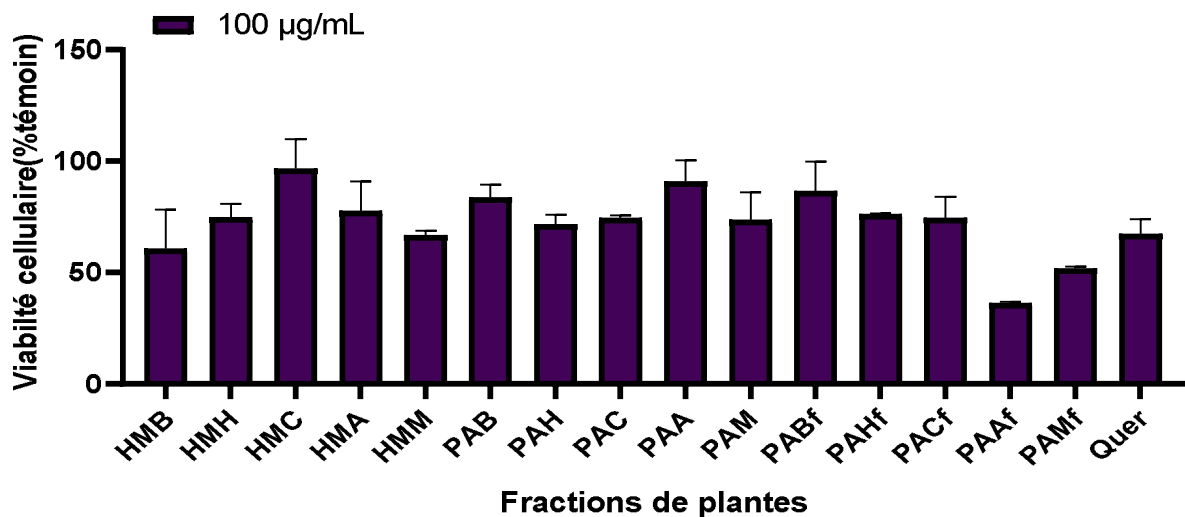


Figure 26: Viabilité des cellules RAW 264.7 en présence des fractions de plantes à la concentration de 100 µg/mL

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type ($n=3$). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l'hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l'hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; Quer: Quercétine.

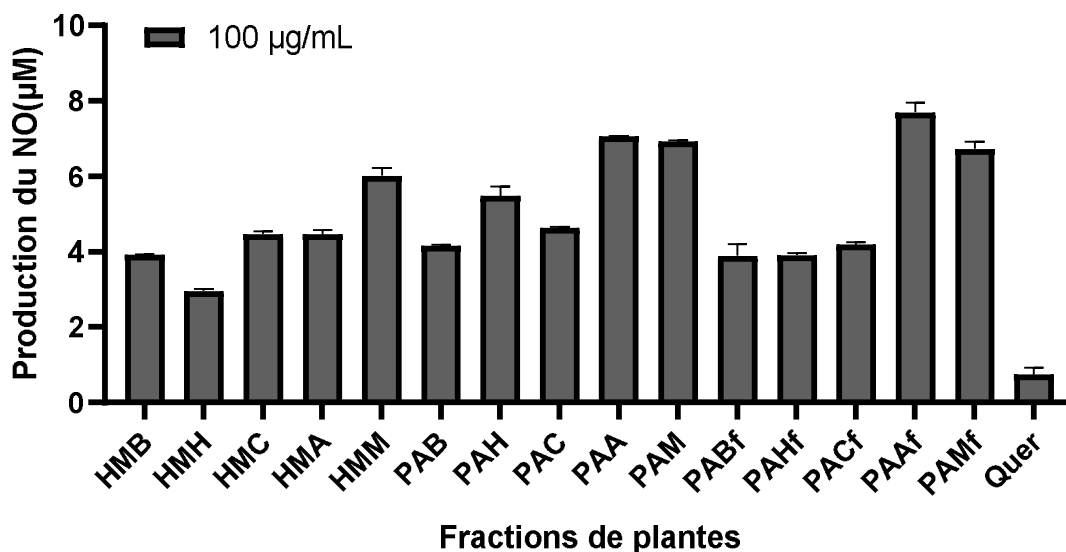


Figure 27 : Production du NO par les RAW 264.7 en présence des fractions de plantes à la concentration de 100µg/mL.

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; Quer: Quercétine.

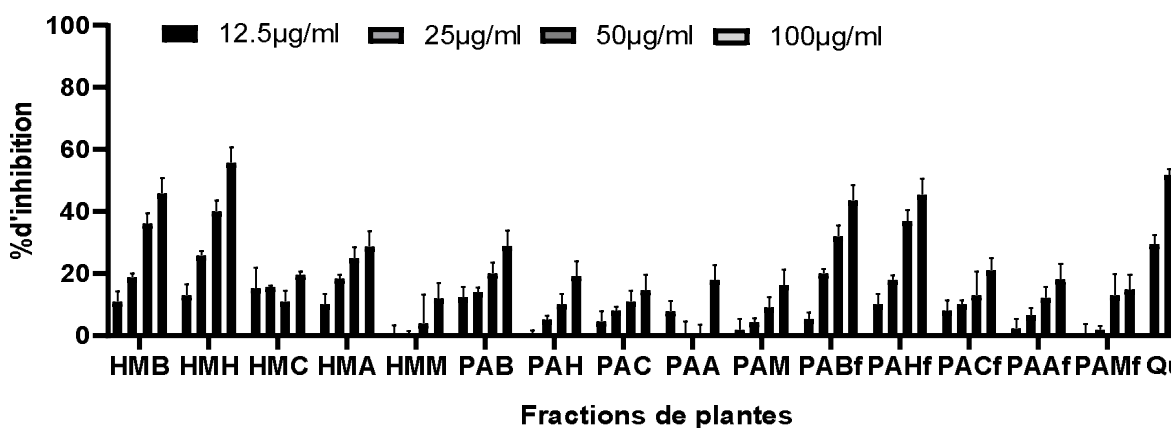


Figure 28 : Inhibition par les fractions de plantes à différentes concentrations de la production du NO par cellules RAW 264.7

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; Quer: Quercétine..

Tableau VIII : Viabilité cellulaire et inhibition de la production du NO par les macrophages activés (RAW264.7) en présence des fractions de plantes

Fraction de plantes	NO (μM)	% inhibition de production du NO (\AA 100 $\mu\text{g/mL}$)	% viabilité (\AA 100 $\mu\text{g/mL}$)	Production du NO IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HMB	3,91 \pm 0,01	45,19 \pm 1,83	60,7 \pm 17,31	> 100
HMH	2,95 \pm 0,05	55,19 \pm 3,34	74,71 \pm 5,97	65,55 \pm 0,25 ^a
HMC	4,46 \pm 0,08	19,65 \pm 0,30	96,53 \pm 13,30	> 100
HMA	4,45 \pm 0,12	28,28 \pm 2,43	77,60 \pm 13,30	> 100
HMM	6,01 \pm 0,21	13,75 \pm 0,67	66,56 \pm 2,28	> 100
PAB	4,16 \pm 0,03	28,41 \pm 2,50	83,61 \pm 5,87	> 100
PAH	5,48 \pm 0,25	19,54 \pm 0,14	71,55 \pm 4,26	> 100
PAC	4,63 \pm 0,03	14,32 \pm 0,04	74,55 \pm 1,05	> 100
PAA	7,06 \pm 0,01	17,38 \pm 0,04	90,74 \pm 9,71	> 100
PAM	6,92 \pm 0,03	16,12 \pm 0,12	73,65 \pm 12,19	> 100
PABf	3,89 \pm 0,31	43,58 \pm 0,27	86,56 \pm 13,31	> 100
PAHf	3,90 \pm 0,06	45,49 \pm 1,08	76,22 \pm 0,26	> 100
PACf	4,19 \pm 0,06	21,12 \pm 0,5	74,43 \pm 9,35	> 100
PAAf	7,69 \pm 0,26	18,16 \pm 1,08	36,18 \pm 0,63	> 100
PAM	6,72 \pm 0,19	14,78 \pm 0,54	51,74 \pm 0,99	> 100
Quer	0,74 \pm 0,19	86,72 \pm 3,56	67,24 \pm 6,72	15,13 \pm 0,25 ^b

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type (n=3). Sur une même colonne, les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; Quer: Quercetine

✓ Inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase

L'activité inhibitrice de la 15-lipoxygénase (15 LOX) a été mesurée par oxydation ferrique et du xylénol orange (FOX). D'une manière générale, le pourcentage d'inhibition de la 15-lipoxygénase augmente avec la concentration en fractions. Le pourcentage d'inhibition de toutes les fractions varie de 0,00 à 100 % comme l'indique la figure 29 ci-dessous. La fraction HMH a présenté une bonne activité inhibitrice anti-15 LOX avec une CI_{50} de

46,80 $\mu\text{g/mL}$. En outre, la fraction PAH a présenté l'activité inhibitrice anti-15 LOX la plus élevée avec une IC_{50} de 27,55 $\mu\text{g/mL}$, ce qui est comparable à celle de la quercétine, le témoin positif (IC_{50} de 24,55 $\mu\text{g/mL}$). L'extrait brut de PA et la fraction de chlorure de méthylène se sont également révélés actifs contre 15-LOX avec des valeurs de CI_{50} de 79,15 $\mu\text{g/mL}$ et de 96,35 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Les valeurs de CI_{50} obtenues sont résumées dans le tableau IX.

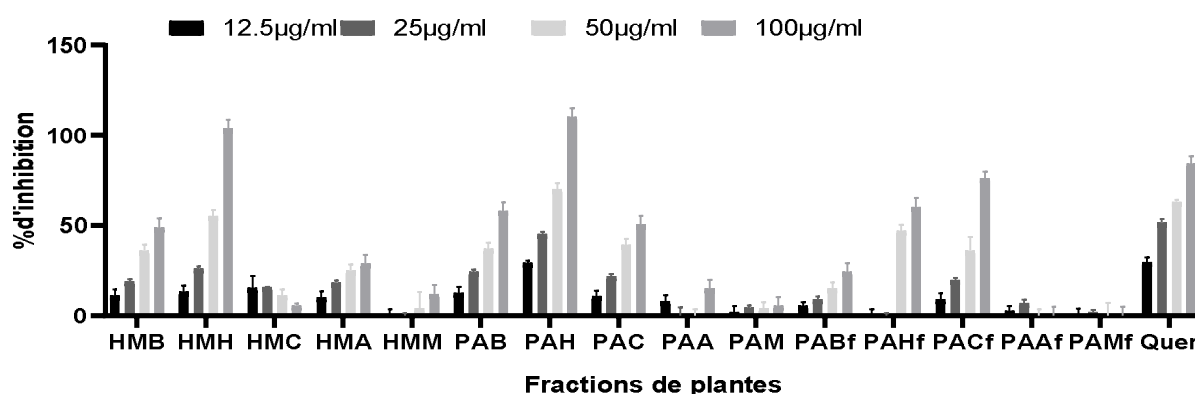


Figure 29 : Inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase par les fractions de plantes à différentes concentrations

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type ($n=3$). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; Quer: Quercetine

Tableau IX : Valeurs des CI_{50} de quelques fractions de plantes pour l'inhibition de la lipoxygénase b

Fractions de plantes	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Quer	24,55 \pm 0,25 ^a
PAH	27,55 \pm 2,15 ^a
HMH	46,80 \pm 1,40 ^c
PACf	62,85 \pm 2,75 ^d
PAHf	65,00 \pm 2,20 ^d
PAB	79,15 \pm 1,55 ^e
PAC	96,35 \pm 0,95 ^f

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type ($n=3$). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type ($n=3$), Dans une même colonne, les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes ($p<0,05$); HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; Quer: Quercetine.

III.2.3- Inhibition de l'activité des enzymes élastase et tyrosinase par les fractions de plantes

✓ Inhibition de l'activité de l'élastase

L'effet inhibiteur des fractions de plantes sur l'élastase a été évalué. Les résultats indiquent que toutes les fractions ont inhibé considérablement l'enzyme (inhibition supérieure à 50%), comme l'indique la figure 30 ci-dessous. La fraction hexanique de PA a présenté le pourcentage d'inhibition le plus élevé à 100 µg/mL par rapport aux autres fractions de plantes. Cette fraction a été sélectionnée et la valeur de CI_{50} déterminée. Son activité a été concentration dépendante (figure 31) avec une CI_{50} de 15,40 µg/mL comparable à celle (5,5 µg/mL) de l'epigalocatechinegallate. Les valeurs des CI_{50} sont présentées dans le tableau X.

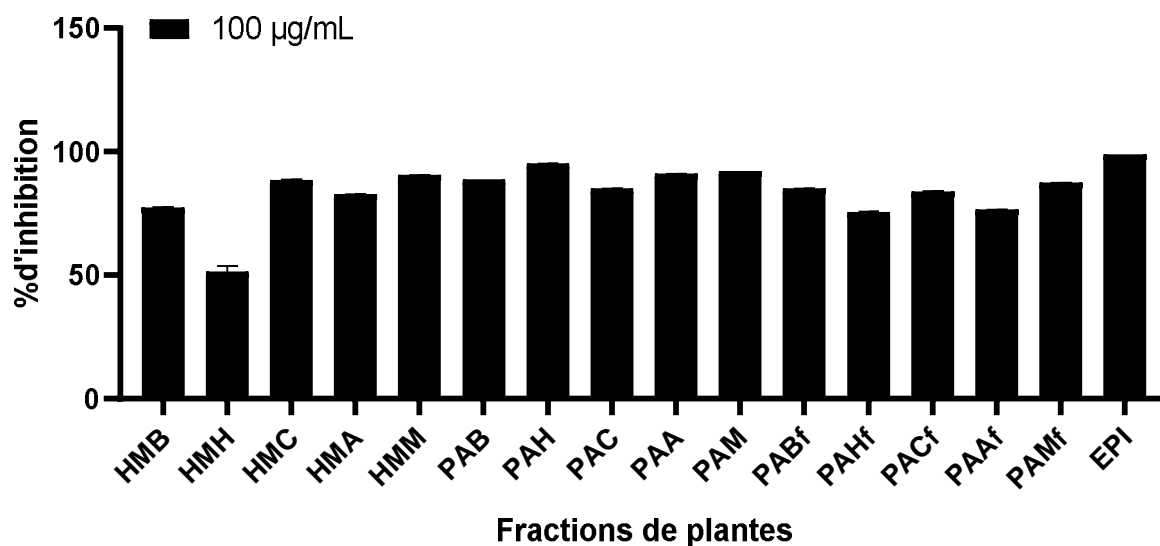


Figure 30 : Inhibition de l'activité de l'élastase par les fractions de plantes à la concentration de 100µg/mL

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l'hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l'hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; EPI, Epigalocatechinegallate.

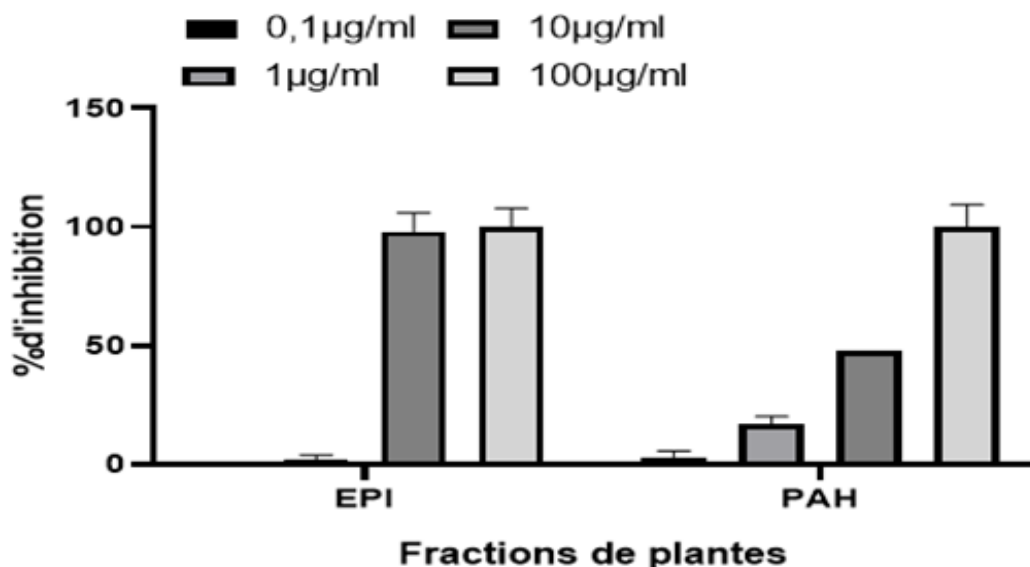


Figure 31 : Inhibition de l'activité de l'élastase par la fraction hexanique de PA à différentes concentrations

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type (n=3). EPI: Epigalocachetingallate; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane

Tableau X : Valeurs des CI₅₀ des fractions de plantes pour l'inhibition de l'élastase

CI ₅₀ (µg/ml)	
EPI	PAH
5,5 \pm 0,1 ^a	15,8 \pm 6,7 ^a

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type (n=3). ^a Les valeurs ne sont pas significativement différentes (p<0,05). EPI, Epigalocachetinegallate; PAH, *P. aurantiacum* fraction à l' hexane.

✓ Inhibition de l'activité de la tyrosinase

Dans cet essai, toutes les fractions ont été testées à une concentration unique de 100 µg/mL ainsi que la vitamine C (témoin positif). Les pourcentages d'inhibition variaient de 12 à 96,64% (figure 32). Les fractions hexanique (47,00 \pm 2,12%) et méthanolique (45,00 \pm 0,56%) d'HM ainsi que la fraction hexanique de PA (42,00 \pm 6,11%) ont inhibé la tyrosinase avec une activité inférieure à celle de la vitamine C (96,64 \pm 0,97%).

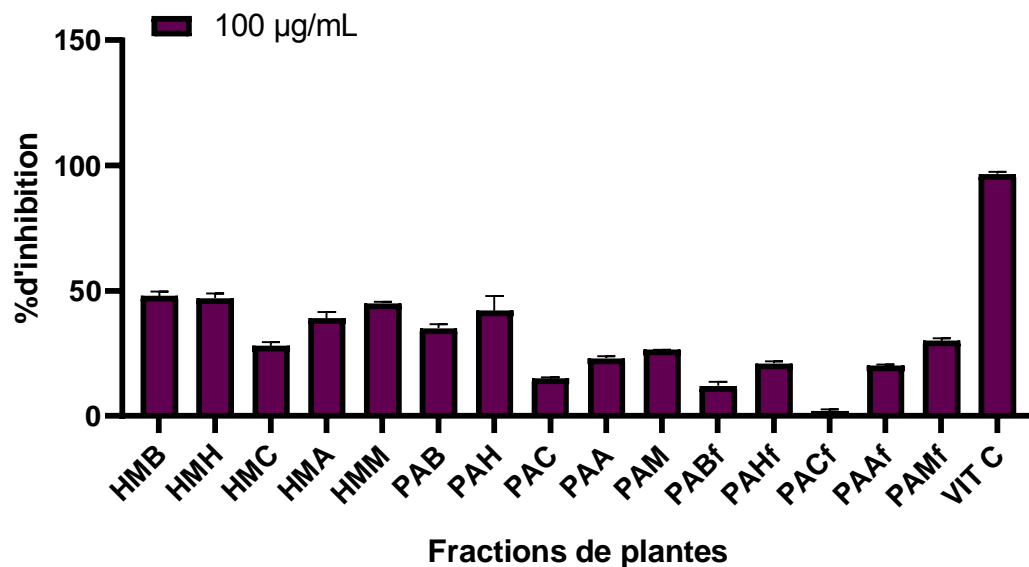


Figure 32 : Inhibition de l'activité de la tyrosinase par les fractions de plantes à la concentration de 100µg/mL

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type (n=3). HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: *H. madagascariensis* fraction à l' hexane; HMC: *H. madagascariensis* fraction au chlorure de méthylène; HMA: *H. madagascariensis* fraction à l'acétate d'éthyle; HMM: *H. madagascariensis* fraction au méthanol; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l' hexane; PAC: *P. aurantiacum* fraction au chlorure de méthylène; PAA: *P. aurantiacum* fraction à l'acétate d'éthyle; PAM: *P. aurantiacum* fraction au méthanol; PABf: *P. aurantiacum* feuille extrait brut; PAHf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l' hexane; PACf: *P. aurantiacum* feuille fraction au chlorure de méthylène; PAAf: *P. aurantiacum* feuille fraction à l'acétate d'éthyle; PAMf: *P. aurantiacum* feuille fraction au méthanol; VIT C: vitamine C

III.2.4- Conclusion partielle 1

Au terme de cette première partie dont l'objectif était de déterminer les fractions de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* possédant à la fois un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase, il ressort que :

- les fractions : hexanique, méthanolique et à l'acétate d'éthyle de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* possèdent un potentiel antioxydant;
- les fractions : hexanique et au chlorure de méthylène de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* possèdent un potentiel anti-inflammatoire;
- les fractions hexanique et méthanolique de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* possèdent un potentiel anti-tyrosinase et anti-élastase.

A ce niveau des analyses, seules les fractions hexanique et méthanolique de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* ont démontré à la fois les activités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase. Ces fractions ont été sélectionnées comme fractions actives pour la suite des expériences.

III.3- Activité de protection des cellules (NIH/3T3 et B16F10) de peau de souris par les fractions actives de plantes et dommages induits par les rayons UVB

Les fractions que nous avons sélectionné sont celle que nous allons utiliser dans cette partie compte tenu du fait que les radiations ultraviolettes provenant des rayonnements solaires sont responsables de plus de 80% des dégâts cutanés, un modèle cellulaire de dommage cutané induit par ces rayonnements permettrait de tester ces fractions dans des conditions proches de la réalité d'autant plus que sur le plan éthique, l'utilisation des animaux n'est plus acceptée en cosmétique. Ainsi, les cellules de peaux de souris (fibroblastes et mélanomes) ont été prétraitées avec les fractions de plantes actives et exposés aux rayons UVB dans le but de sélectionner parmi ces fractions de plantes celles pouvant protéger ces cellules des dommages induits par les rayons UVB.

III.3.1- Dommages induits par les rayons UVB dans les cellules (NIH/3T3 et B16F10) de peau de souris

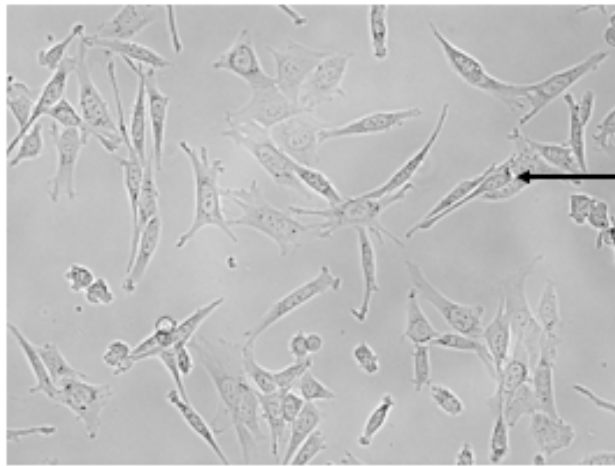
Les rayons ultraviolets B induisent le stress oxydatif, une réduction de la biosynthèse du collagène dans les fibroblastes et une dégradation du collagène formé par les métalloprotéinases. En outre, ils entraînent une augmentation de la synthèse de la mélanine couplée à une induction des gènes de la famille des tyrosinases (Lee *et al.*, 2017; Wiegand *et al.*, 2017).

III.3.1.1- Conditions expérimentales à l'altération morphologique et la modification des gènes de métalloprotéinase matricielle-1(MMP-1) et de procollagène de type 1(COL1A1) après irradiation des fibroblastes (NIH/3T3) par les rayons UVB

Les rayons UVB (280-315 nm) ont été utilisés dans cette étude et les fibroblastes (NIH/3T3) ont été irradiés à des intensités de 29,7 ou 39,6 mJ/cm² (faible et forte intensités respectivement) pour évaluer l'impact négatif sur la morphologie cellulaire, sur les niveaux d'ARNm du collagène de type 1 (COL1A1) et de la métalloprotéase matricielle (MMP-1). Les résultats révèlent que des intensités plus faibles (29,7 mJ/cm²) et plus élevées d'UVB (39,6 mJ/cm²) induisent une altération de la morphologie cellulaire, une réduction significative de la viabilité cellulaire (figure 33), une diminution du niveau d'ARNm de COL1A1 (figure 34 A et C) et une augmentation de l'ARNm de la MMP-1(figure 34 B et D) de manière concentration-dépendante. Sur la base de ces résultats, 29,7 mJ/cm² a été sélectionné pour des études ultérieures parce que ayant enregistré des indices de mort cellulaire significativement plus basses.

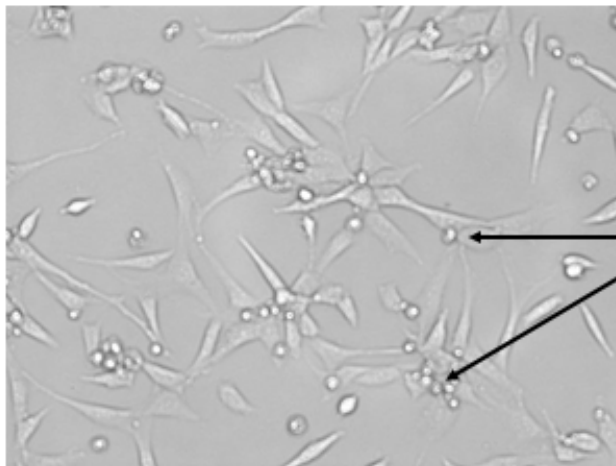
III.3.1.2- Conditions expérimentales à la modification des gènes tyrosinase(TYR) et tyrosinase related proteine-1 (TRP-1) dans les cellules B16F10 après irradiation des mélanomes (B16F10) par les rayons UVB

Les niveaux d'expression des gènes de TYR et de TRP-1 induits par les UVB (6,6 et 39,6 mJ/cm²) ont été initialement étudiés dans des cellules B16F10 issues des passages 20 à 27. Avec ces cellules, on observe sur la figure 35 A que la morphologie cellulaire n'a pas été modifiée ainsi que les niveaux d'ARNm de TYR et de TRP-1 après une exposition aux UV-B (figure 35 B et D; figure 34 C et E). Cependant, avec les cellules issues des passages 28 et plus, on a observé une augmentation significative de 2,5 fois des niveaux d'ARNm de TYR et TRP-1 comme présenté sur la figure 35 (F, G) sans modification de la morphologie cellulaire.



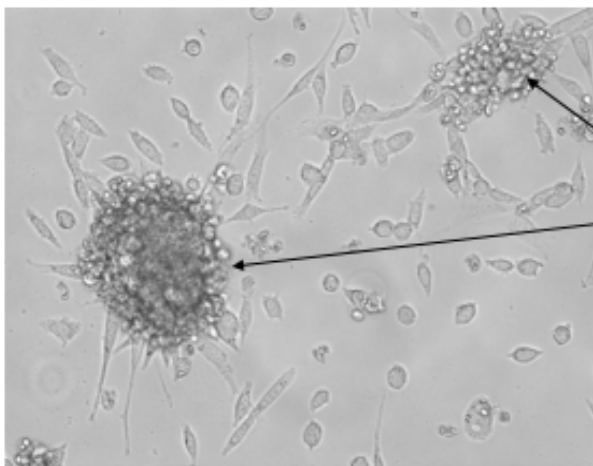
Cellule normale

TEMOIN



Cellules modifiées après irradiation

29.7 mJ/cm²



Amas cellulaires formés après irradiation

39.6 mJ/cm²

Figure 33 : Modification de la morphologie des cellules NIH/3T3 irradiées par les rayons UVB

Photographie des cellules NIH/3T3 irradiées ou non par des intensités d'UVB (29,7 et 39,6 mJ/cm²) pendant 45 et 60 secondes.

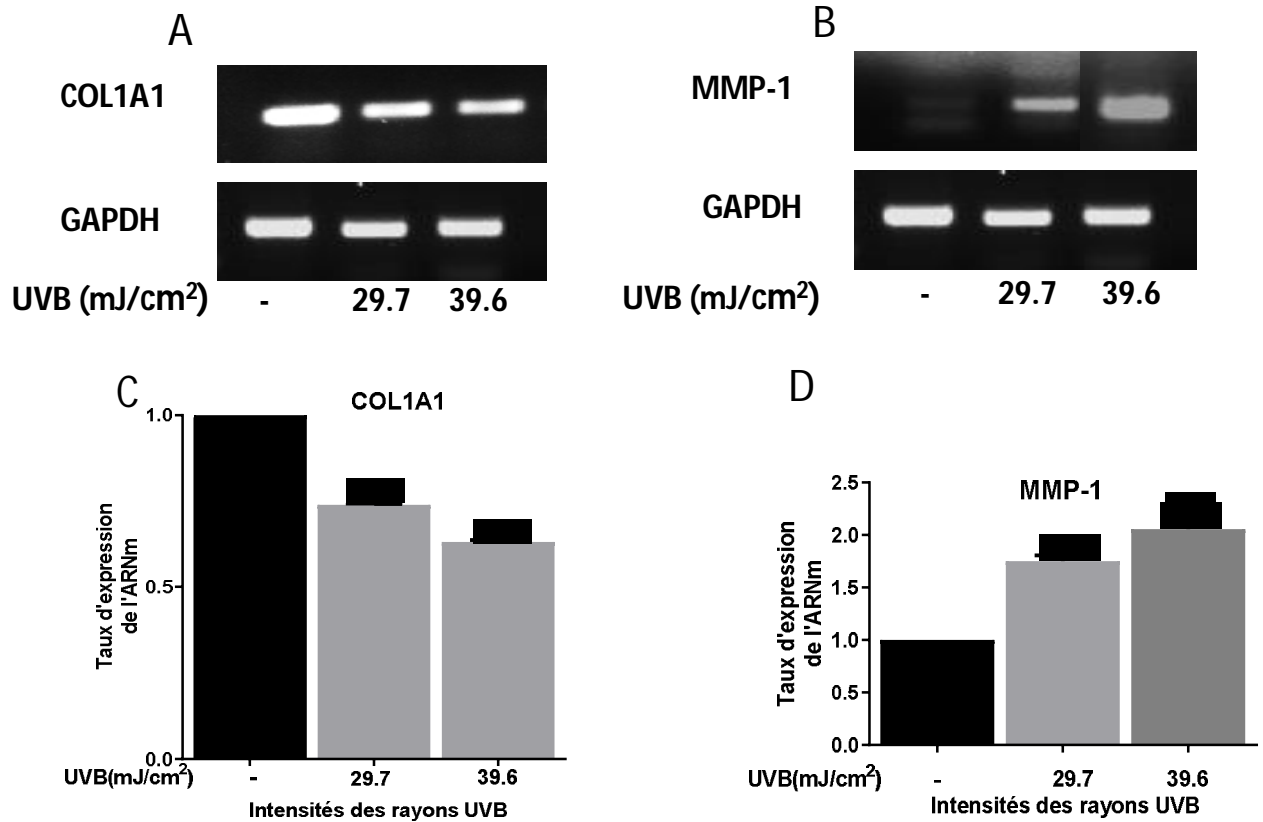


Figure 34 : Modification de l'expression des ARNm des gènes de metalloprotéinase matricielle-1(MMP-1) et de procollagène de type 1(COL1A1) dans les cellules NIH/3T3 irradiées par les rayons UVB

(A, B): gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de COL1A1 et de MMP1 induits par les rayons UVB. (C, D): histogrammes d'analyse densitométrique de l'expression des gènes COL1A1 et de MMP1 par le logiciel image J. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart type ($n = 3$), **** $P < 0.001$ par rapport au groupe témoin. L'ARNm de GAPDH a été utilisé comme témoin interne. COL1A1, procollagène type I; MMP-1, métalloprotéinase-1; GAPDH, glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

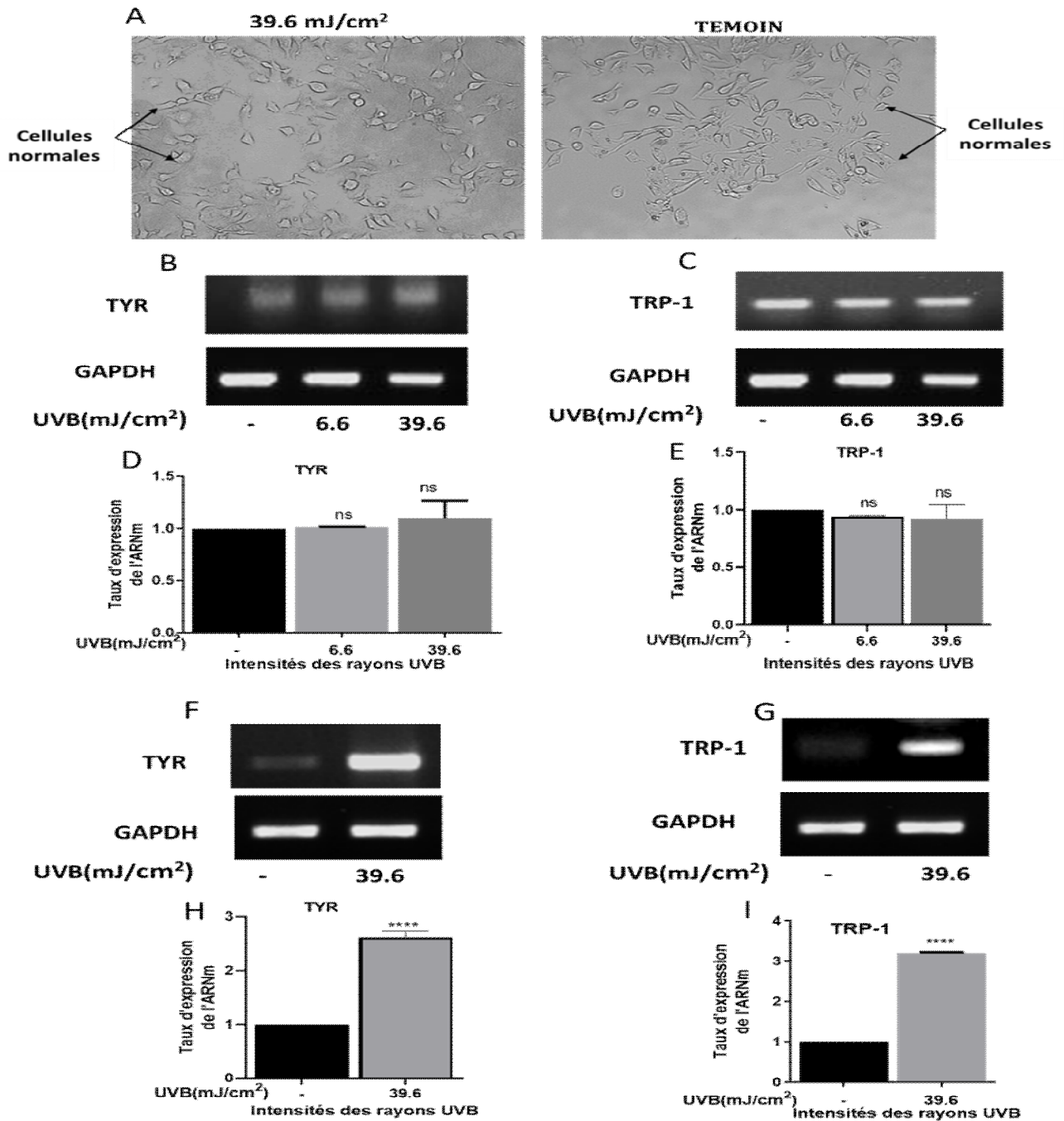


Figure 35 : Induction des dommages par les rayons UVB dans les cellules B16F10

(A): Photographies des cellules B16F10 irradiées ou non par des intensités d'UVB (6,6 et 39,6 mJ/cm²) pendant 60 secondes. (B,C) et (F,G): gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de TYR et de TRP-1 induits par les rayons UVB.(D,E) et (H,I): histogrammes d'analyse densitométrique de l'expression des gènes TYR et de TRP-1 par le logiciel image J. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes ± écart type. (n = 3), **** P<0.001 par rapport au groupe témoin. L'ARNm de GAPDH a été utilisé comme témoin interne. TYR, tyrosinase ; TRP-1, tyrosinase related protein-1; GAPDH, glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

III.3.1.3- Génération du stress oxydatif

Le stress oxydatif intracellulaire a été évalué qualitativement dans les cellules B16F10 et NIH/3T3 par coloration des cellules avec du H₂DCFDA. Les cellules ont été exposées aux intensités UVB indiquées. Un stress oxydatif intracellulaire important marqué par une forte fluorescence verte a été observé après une exposition aux UVB (figure 36 A et B). Par contre, avec les cellules non exposées aux rayons UVB, on observe une faible fluorescence verte traduisant ainsi un niveau de stress intracellulaire bas.

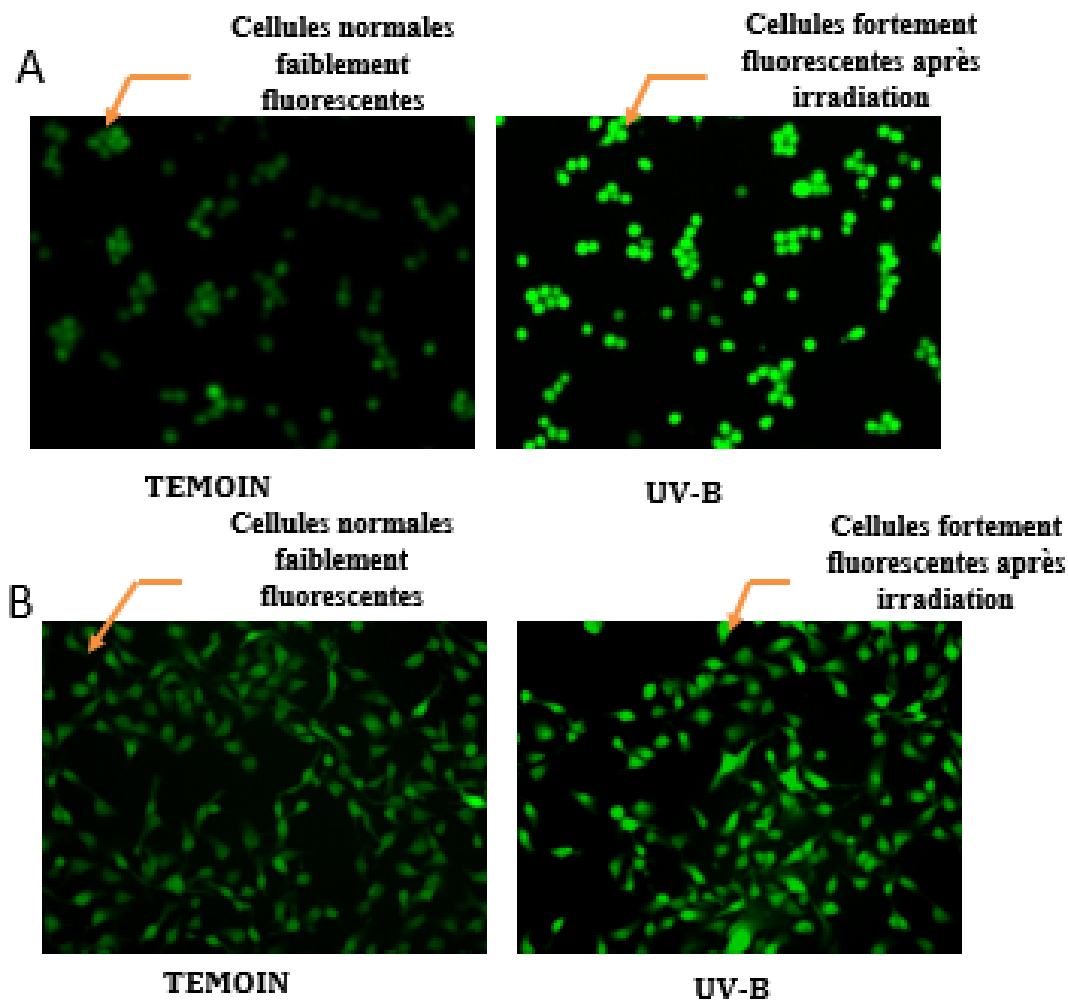


Figure 36 : Fluorescence des cellules NIH/3T3 et B16F10 après irradiation par les rayons UVB

(A): Photographies des cellules NIH/3T3 irradiées ou non par les rayons UVB (27,9 mJ/cm²) pendant 45 secondes et photographiées après 2 h. (B): Photographies des cellules B16F10 irradiées ou non par des les rayons UVB (39,6 mJ/cm²) pendant 60 secondes et photographiées après 2 h.

III.3.2- Effet des fractions actives sur les fibroblastes et les mélanomes de peau de souris irradiées par les rayons UVB

III.3.2.1- Effet des fractions actives sur la viabilité cellulaire et sur l'expression des gènes d'intérêt

Les fibroblastes (NIH/3T3) et les mélanomes (B16F10) ont été traités par les différentes concentrations des fractions actives de plantes, afin de mesurer l'effet de ces fractions sur l'expression des ARNm des gènes cibles qui sont modulés par irradiation des cellules par les rayons UVB. A l'issue des expériences, la viabilité a été mesurée.

III.3.2.1.1- Effet des fractions actives sur la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée sur des lignées de cellules B16F10 et NIH/3T3 en utilisant le test au MTT. Il a été constaté que les fractions à l'hexane et au méthanol ainsi que les extraits bruts de HM et de PA étaient non toxiques à 12,5, 25 et 50 µg / mL sur des cellules fibroblastes NIH/3T3 (figure 37 A et B). En revanche, les extraits bruts et la fraction à HMH ont entraîné une baisse de la viabilité cellulaire à la concentration de 100 µg/mL. Il est intéressant de noter qu'après fractionnement de l'extrait brut d'HM, les fractions d'hexane et de méthanol obtenues étaient moins toxiques à la concentration de 100 µg/mL. D'autre part, l'extrait brut de PA et sa fraction hexanique ont présenté une diminution de la viabilité cellulaire concentration dépendante. La concentration la plus élevée ayant entre 50 et 60% de viabilité cellulaire. Au contraire, la fraction au méthanol s'est révélée non toxique à toutes les concentrations testées (figure. 37 A et B). En outre, nous avons constaté que les extraits bruts d'HM et de PA avec leurs fractions hexanique étaient hautement toxiques sur les cellules mélanomes B16F10 à 100 µg/mL avec une viabilité cellulaire d'environ 30 à 35% (fig. 38 A et B). Les fractions au méthanol d'HM et de PA ne présentaient aucune réduction significative de la viabilité cellulaire, même à la concentration la plus élevée utilisée.

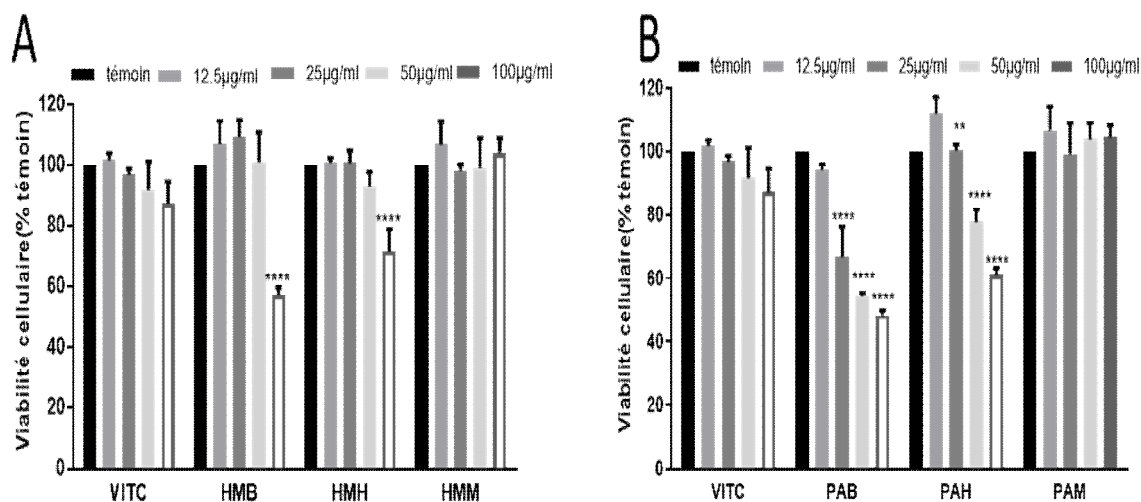


Figure 37 : Effet des fractions de plantes sur la viabilité des fibroblastes NIH3T3

(A, B): Les cellules NIH/3T3 traitées avec différentes concentrations de fractions de plantes de HM et PA, puis incubées pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant le test MTT. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type ($n = 3$). Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$; par rapport au groupe témoin. HMB: *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VIT C: vitamine C.

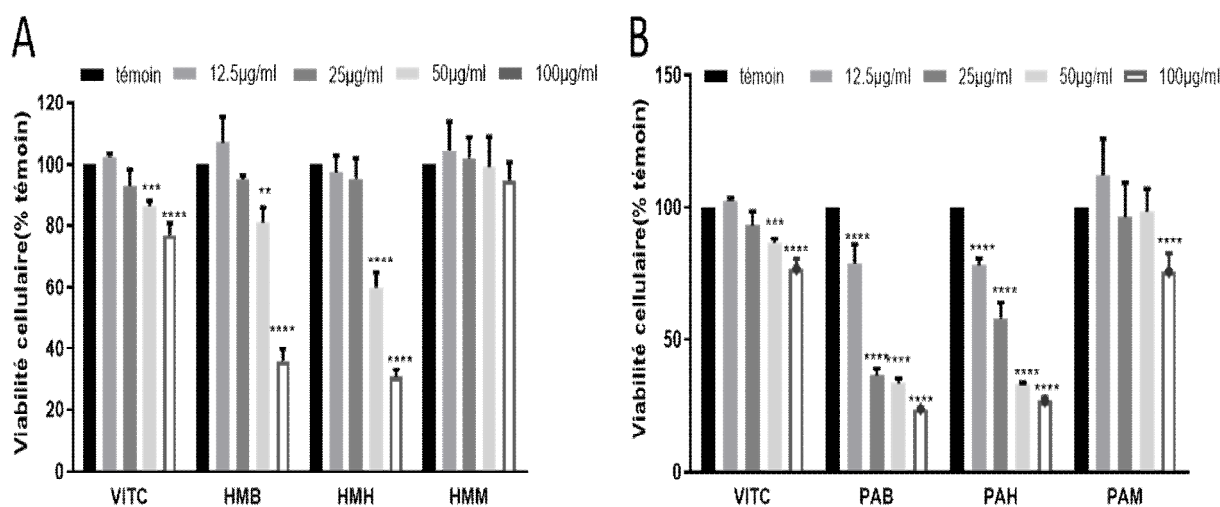


Figure 38 : Effet des fractions de plantes sur la viabilité des mélanomes B16F10

(A, B): Les cellules B16F10 traitées avec différentes concentrations de fractions de plantes de HM et PA, puis incubées pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant le test MTT. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart type. ($n = 3$). Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$; par rapport au groupe témoin. HMB : *H. madagascariensis* extrait brut; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VIT C: vitamine C.

III.3.2.1.2- Repression du gène COL1A1 dans les cellules NIH/3T3 et des gènes TYR et TRP-1 dans les cellules B16F10 par les fractions actives de plantes

Les cellules de fibroblastes NIH/3T3 ont été traitées avec Les concentrations des fractions présentant une viabilité comprise entre 80 et 100%. Afin de sélectionner des fractions de plantes qui réduisent l'expression du gène MMP-1 uniquement. Les niveaux de gènes (COL1A1 et MMP-1) ont été évalués et la vitamine C utilisée comme témoin positif. Les résultats présentés sur la figure 39 montrent que, par rapport aux cellules non traitées, la fraction au méthanol de HM a diminué significativement ($p < 0,001$) l'expression du niveau d'ARNm de COL1A1 de 0,5 fois (figure 39 A), tandis que la fraction hexanique et l'extrait brut de HM, les fractions hexanique et au méthanol de PA ainsi que la vitamine C n'ont induit aucune modification significative des niveaux d'ARNm du procollagène de type 1 (figure 39 A et 39 E). En revanche, toutes les fractions isolées et l'extrait brut de PA et HM ont significativement ($p < 0,001$) réduit les taux d'ARNm de MMP-1 d'au moins 0,7 fois par rapport au groupe témoin négatif (figure 39 B et 39 F).

Les cellules B16F10 ont été traitées avec des fractions afin de sélectionner les fractions qui réduisent les niveaux d'ARNm de TYR et de TRP-1. Bien que toutes les fractions de la plante n'aient pas diminué significativement le niveau d'ARNm de TRP-1, on a observé une diminution significative ($p < 0,05$) du gène TYR, comme le montre la figure 40 A et 40 E. Par conséquent, toutes les fractions ont été sélectionnées pour des investigations ultérieures.

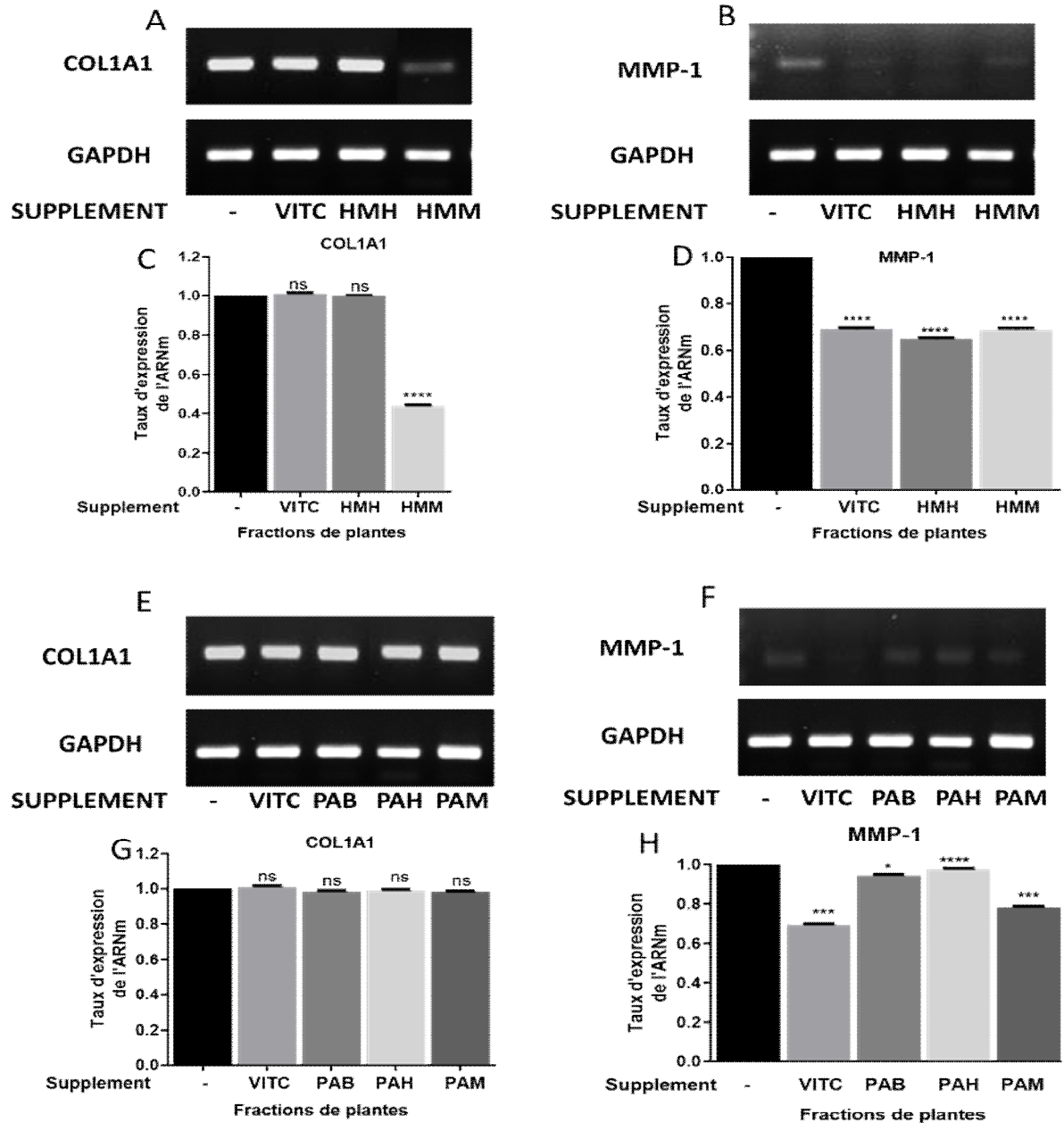


Figure 39 : Taux d'expression des gènes procollagène de type 1 (COL1A1) et de metalloprotéinase matricielle-1(MMP-1) par les fractions de plantes dans les fibroblastes NIH/3T3

(A, B) et (E, F) : gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de COL1A1 et de MMP1 après traitement par les fractions de HM et PA respectivement pendant 24h. (C, D) et (G, H) : histogrammes d'analyse densitométrique de l'expression des gènes COL1A1 et de MMP1 par le logiciel image J. La GAPDH a été utilisé comme témoin interne. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type. (n = 3), * p < 0,05, **P<0.01, **** P<0.001 par rapport au groupe témoin. COL1A1: procollagène type I; MMP-1, matrice métalloprotéinase -1; GAPDH: glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction méthanol *H. madagascariensis*; PA: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

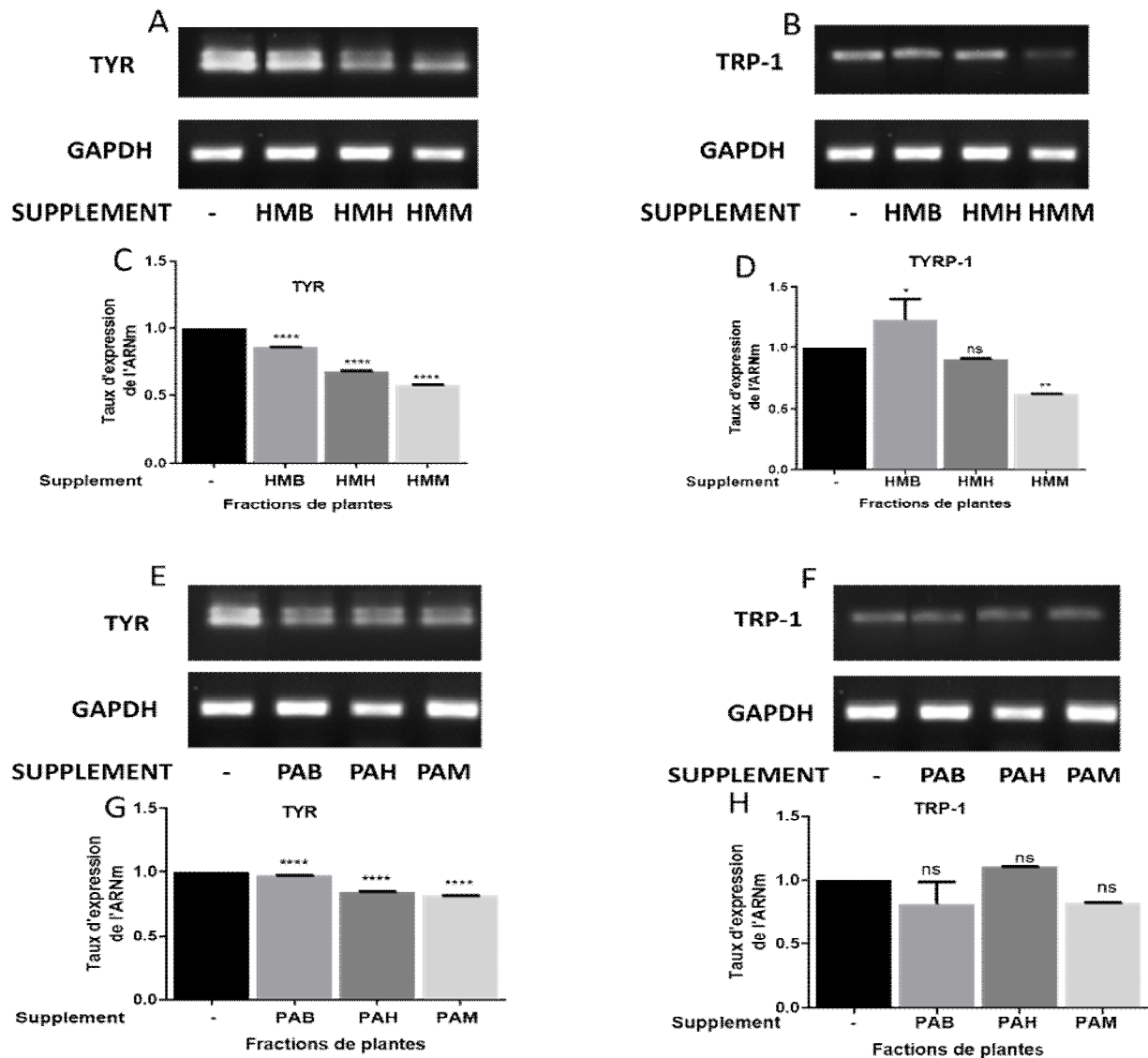


Figure 40 : Taux d'expression des gènes TYR et TRP-1 par les fractions de plantes dans les mélanomes B16F10

(A, B) et (E, F) : gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de TYR et de TRP-1 après traitement par les fractions de HM et PA respectivement pendant 24h. (C, D) et (G, H): histogrammes d'analyse densitométrique de l'expression des gènes TYR et de TRP-1 par le logiciel image J. La GAPDH a été utilisé comme témoin interne. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type. (n = 3), ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$ par rapport au groupe témoin. TYR, tyrosinase ; TRP-1, tyrosinase related protein-1; GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; HMB: extrait brut de *H. madagascariensis*; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*.

III.3.2.2- Effet du prétraitement par les fractions actives de plantes des fibroblastes et des mélanomes de peau des souris irradiés par les rayons UVB

Les mélanomes (B16F10) et les fibroblastes (NIH/3T3) de peau de souris ont été irradiés comme décrit précédemment après prétraitement par les fractions actives de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum*. A l'issue de ces expériences ont été évaluées: l'expression des ARNm du procollagène de type I, de la métalloprotéinase-1 engagés dans la dégradation de la matrice extracellulaire, de la tyrosinase, ainsi que le stress oxydatif intracellulaire et la biosynthèse de la mélanine. Ces résultats sont présentés ainsi qu'il suit :

III.3.2.2.1- Protection de la morphologie cellulaire des fibroblastes NIH/3T3

Les cellules de fibroblastes NIH/3T3 ont été prétraitées par les fractions de plantes sélectionnées ou par la vitamine C puis, exposées aux rayons UVB pendant 45 secondes, les cellules ont été par la suite photographiées par une station d'imagerie cellulaire. Les cellules NIH/3T3 exposées à l'UVB (29,7 mJ/cm²) montrent une altération de la morphologie cellulaire, comme illustrée sur la figure 41 mais le prétraitement avec les fractions a empêché à des degrés divers la déformation de la morphologie cellulaire induite par les UV.

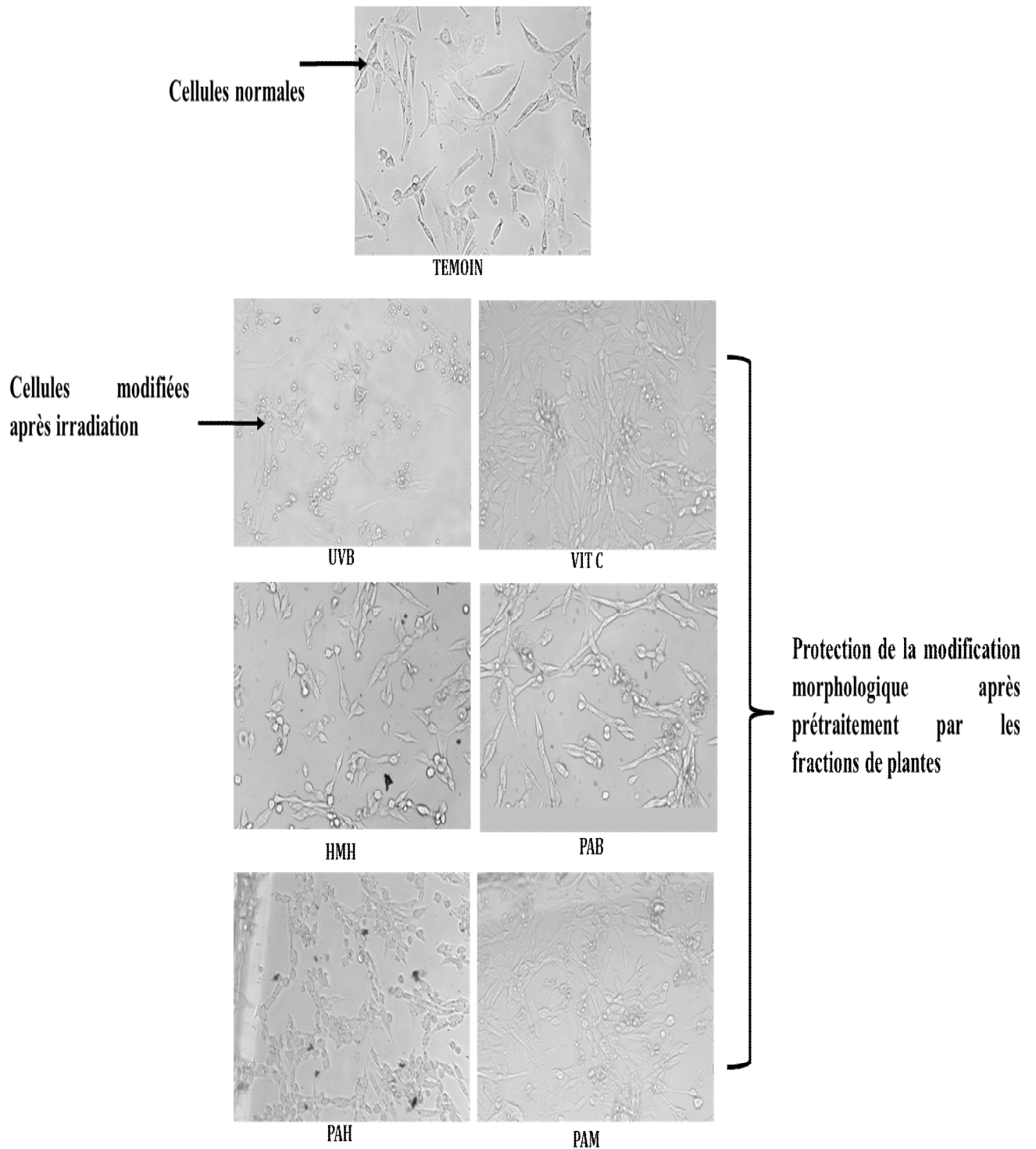


Figure 41 : Photoprotection des changements morphologiques des cellules NIH/3T3 par les fractions de plantes

*Photographies des cellules NIH/3T3 prétraitées ou non par les fractions de plante sélectionnées et irradiées ou non par les rayons UVB (29,7 mJ/cm²), puis photographiées après 2 h HMH : fraction à l'hexane de *H. madagascariensis* ; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.*

III.3.2.2.2- Taux d'expression du gène de la métalloprotéinase matricielle-1 (MMP-1) et du gène de procollagène de type I (COL1A1) dans les fibroblastes NIH/3T3

Afin de tester les effets de fractions sélectionnées sur la synthèse des gènes COL1A1 et MMP-1, les niveaux d'ARNm de ces gènes ont été mesurés dans des cellules non irradiées ou irradiées aux UVB après traitement préalable ou non avec des fractions ou de la vitamine C. L'analyse par Transcription inverse PCR a montré que les UVB induisaient une diminution des niveaux d'ARNm de COL1A1 et une augmentation des niveaux d'ARNm de MMP-1 respectivement de 0,6 et 2 fois par rapport aux cellules non irradiées (figure 45 A et B). La fraction hexanique de HM et la fraction au méthanol de PA induisent une augmentation significative ($p < 0,001$) de COL1A1 et une diminution des niveaux d'ARNm de MMP-1 respectivement de 1,3 et 0,8 fois par rapport aux cellules irradiées par UVB (figure 42 A et E), tandis que l'extrait brut et la fraction hexanique de PA n'ont pas empêché les changements induits par UVB dans les deux niveaux de gènes (figure 42 E et 45 F).

III.3.2.2.3- Taux d'expression des gènes de TYR et TRP-1 dans les mélanomes B16F10

Les cellules ont été prétraitées avec des fractions sélectionnées suivies d'une irradiation aux rayons UVB. Le traitement aux rayons UVB a induit une augmentation significative ($P < 0.001$) des niveaux d'ARNm de TYR et TRP-1 respectivement de 2,6 et 3,3 fois (figure 43) par rapport aux cellules non irradiées. La vitamine C, la fraction à l'hexane de HM et différentes fractions de PA ont induit une diminution significative ($P < 0.001$) du niveau d'ARNm de TYR d'environ 0,55 fois par rapport aux cellules irradiées (figure 43 A et 46 E). La fraction au méthanol de HM n'a montré aucun changement du niveau d'ARNm de TYR, mais a significativement ($P < 0.001$) diminué le niveau d'ARNm de TRP-1 de 1,33 fois par rapport aux cellules irradiées (figure 43 A et B). Au contraire, les fractions PAH et PAM ont induit une diminution significative ($P < 0.001$) du niveau d'ARNm de TRP-1 (figure 43 E et F), tandis que la fraction HMM a induit une augmentation 1,3 fois plus importante (figure 43 B) par rapport aux cellules irradiées.

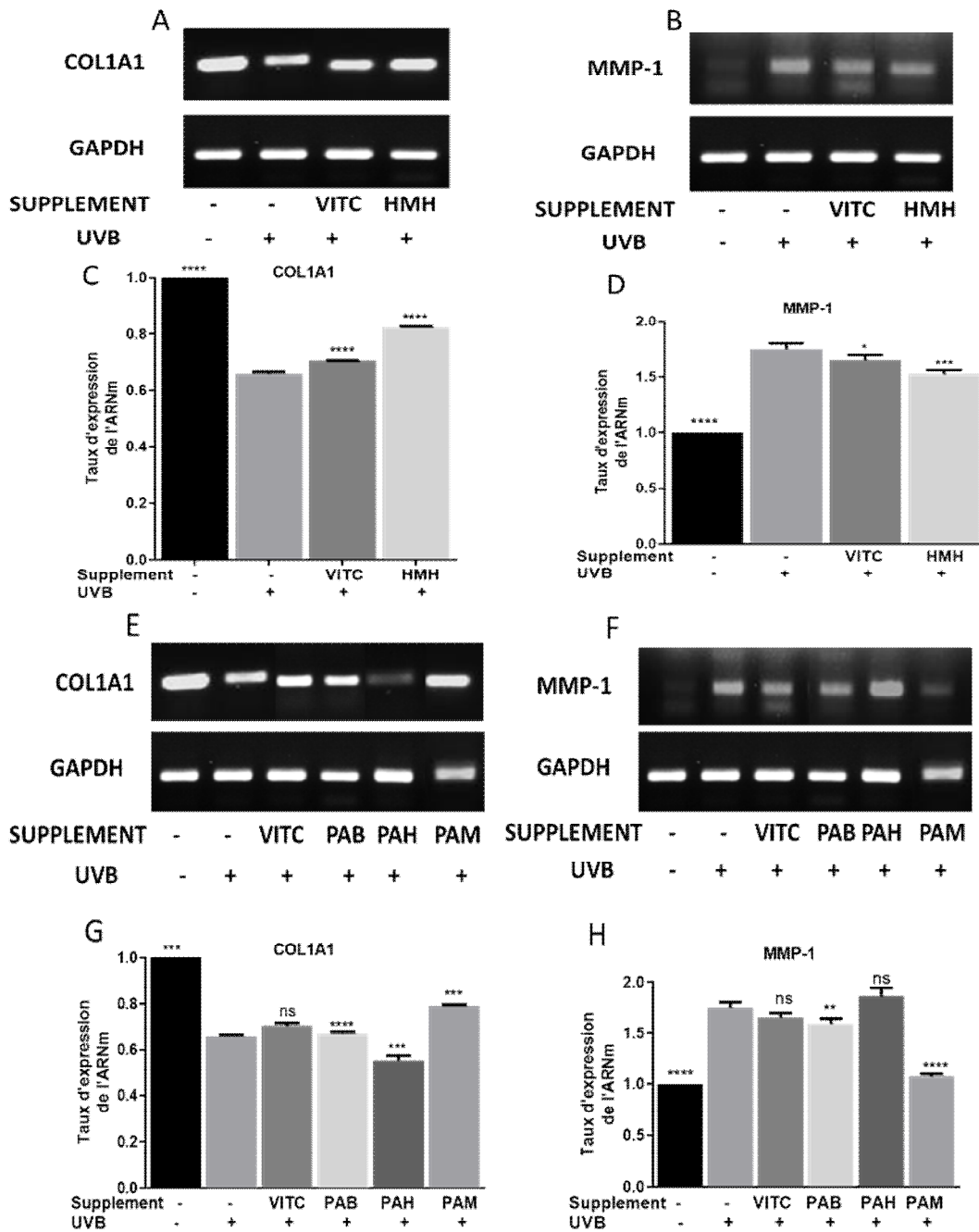


Figure 42 : Photoprotection des gènes du pro-collagène de type I et la matrice métalloprotéinase-1 dans les cellules NIH/3T3 des fractions de plantes

(A, B) et (E, F): gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de COL1A1 et de MMP-1 dans les cellules NIH/3T3 après prétraitées ou non par les fractions de plante sélectionnées et irradiées ou non par les rayons UVB (29,7 mJ/cm²). (C, D) et (G, H): histogrammes d'analyse densitométrique de l'expression des gènes COL1A1 et de MMP-1 par le logiciel image J. La GAPDH a été utilisé comme témoin interne. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type. (n = 3), * p < 0,05, **P < 0,01, **** P < 0,001 par rapport au groupe exposé aux UVB. Col1A1 : procollagène type I; MMP-1: matrice métalloprotéinase -1; GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

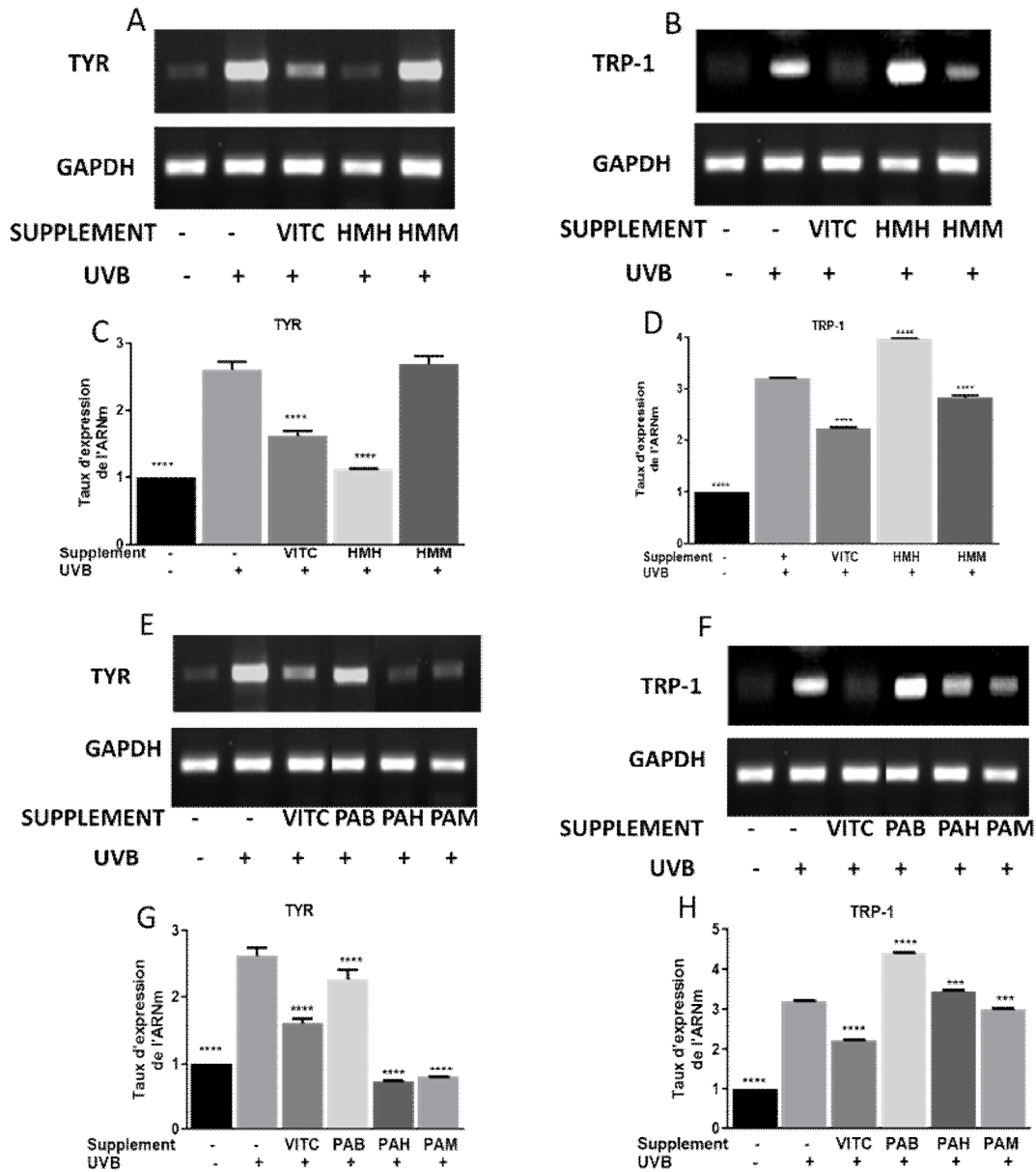


Figure 43 : Photoprotection des gènes de TYR et TRP-1 dans les cellules B16F10 par les fractions de plantes

(A, B) et (E, F): gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de TYR et de TRP-1 dans les cellules B16F10 après prétraitées ou non par les fractions de plante sélectionnées et irradiées ou non par les rayons UVB (29,7 mJ/cm²). (C, D) et (G, H): histogrammes d'analyse densitométriques de l'expression des gènes TYR et de TRP-1 par le logiciel image J. La GAPDH a été utilisé comme témoin interne. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type. (n = 3), * p < 0,05, **P < 0,01, **** P < 0,001 par rapport au groupe exposé aux UVB. . TYR, tyrosinase ; TRP-1, tyrosinase related protein-1; GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

III.3.2.2.4- Inhibition du stress oxydatif dans les cellules B16F10 et NIH/3T3

Le stress oxydatif intracellulaire a été évalué dans les cellules B16F10 et NIH/3T3 par coloration des cellules avec du H₂DCFDA. Les cellules ont été prétraitées avec des fractions de plantes ou de vitamine C pendant 2 h, puis ont été exposées aux intensités UVB indiquées. Un stress oxydatif intracellulaire important indiqué par une forte fluorescence verte après une exposition aux UVB a été observé dans les cellules non prétraitées alors que les cellules prétraitées avec les différentes fractions de plantes ou à la vitamine C ont présenté un degré de fluorescence plus faible. Ces observations sont illustrées sur les figures. 44 et 45.

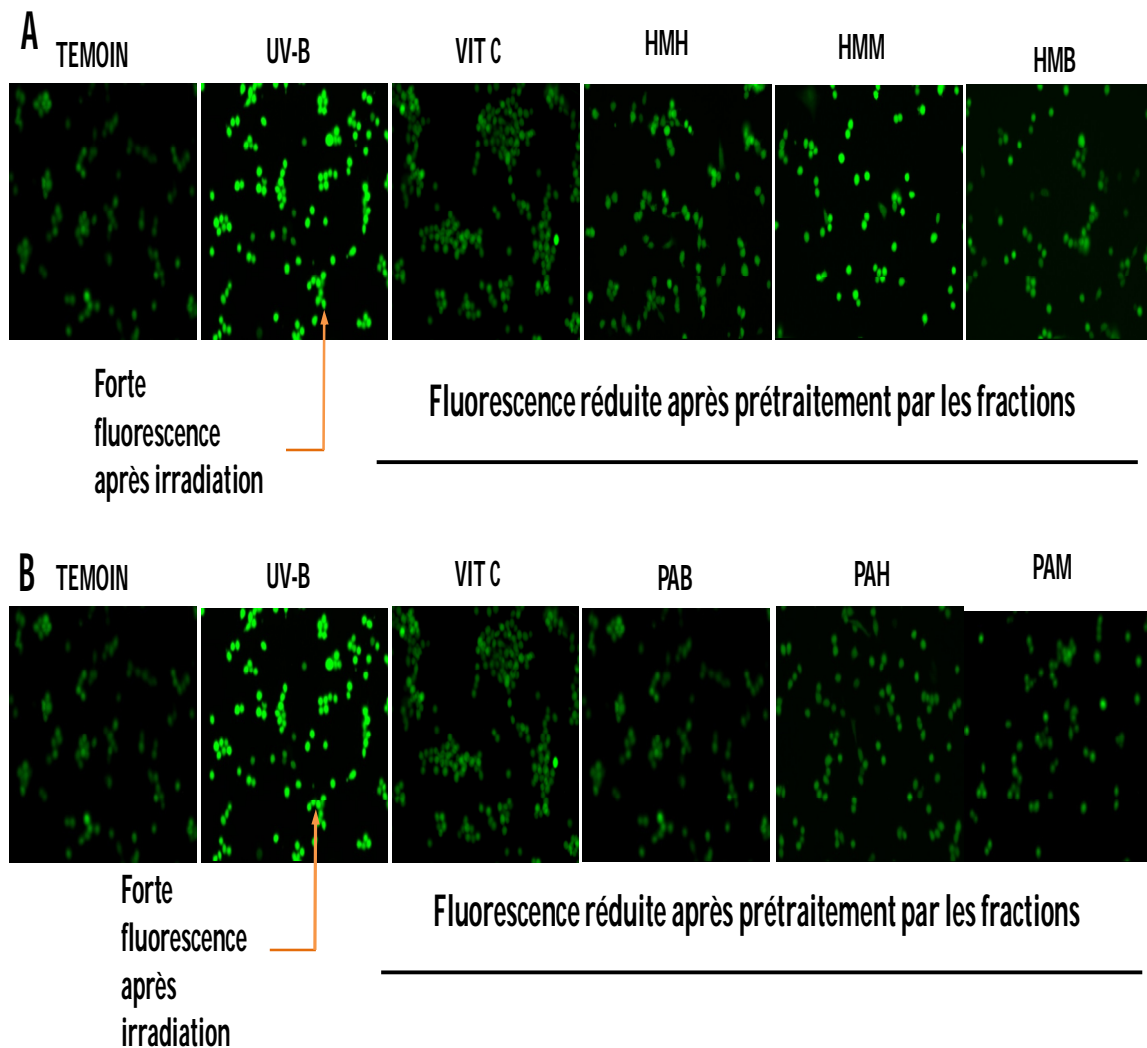


Figure 44 : Fluorescence des fibroblastes NIH/3T3 après traitement par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB

(A, B) : Photographies des cellules NIH/3T3 prétraitées ou non par les fractions de plantes sélectionnées et irradiées ou non par les rayons UVB (27,9 mJ/cm²) après 2 h. HMB: extrait brut de *H. madagascariensis*; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

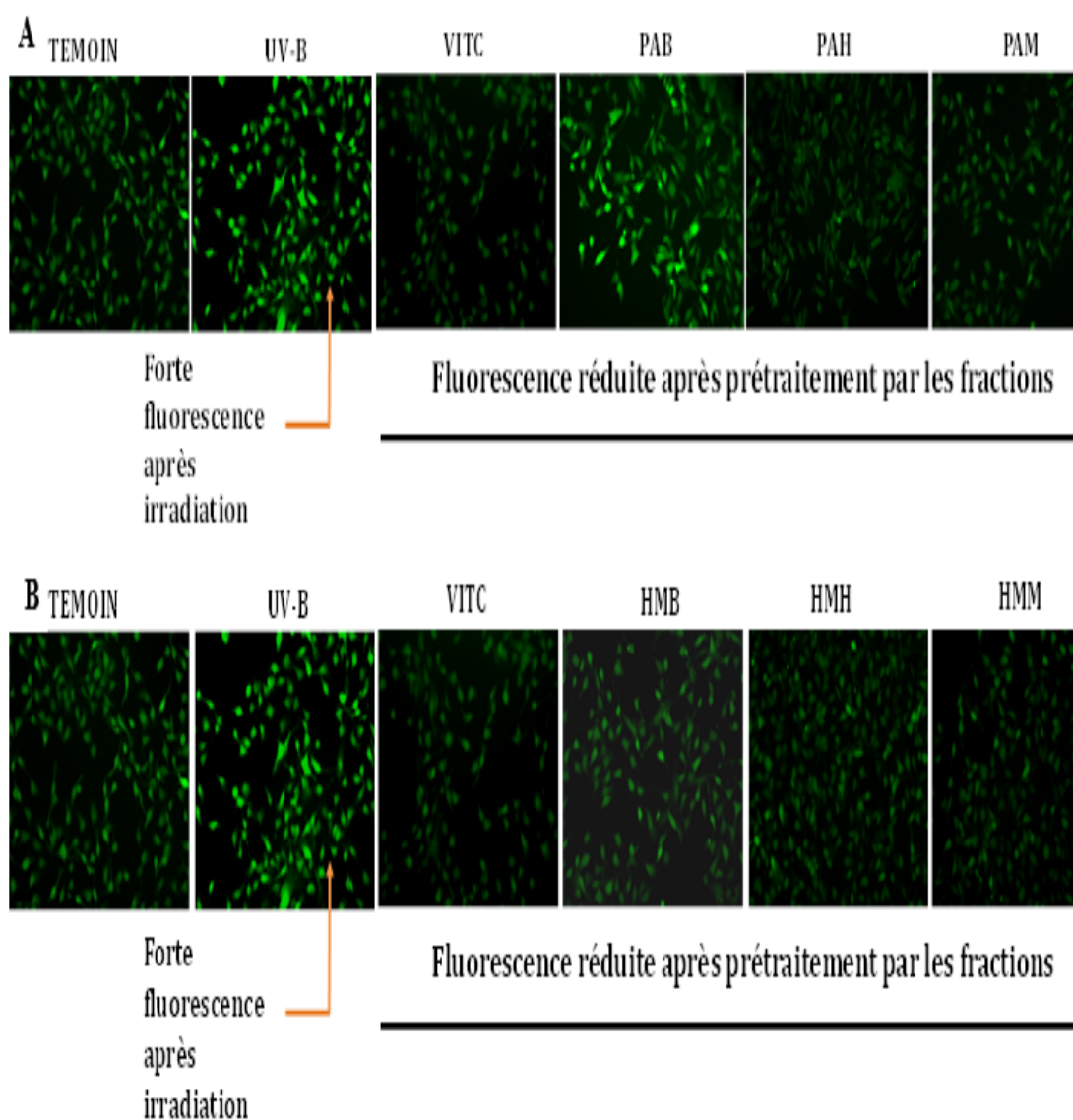


Figure 45 : Fluorescence des mélanomes B16F10 après traitement par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB

(A, B): photographies des cellules B16F10 prétraitées ou non par les fractions de plante sélectionnées et irradiées ou non par les rayons UVB ($39,6 \text{ mJ/cm}^2$) après 2 h. HMB: extrait brut de *H. madagascariensis*; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

III.3.2.2.5- Taux d'expression de l'ARNm du facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf-2) et de l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans des cellules NIH/3T3 et B16F10

Dans notre étude, le niveau d'ARNm de HO-1 était bas à la suite du traitement par les rayons UVB, mais le niveau d'ARNm du Nrf-2 n'a pas été modifié de manière significative par rapport au témoin dans les cellules NIH/3T3. La fraction hexanique de HM a significativement ($P<0.001$) provoqué une augmentation du niveau d'ARNm de HO-1 qui était plus élevée que celle du groupe traité par la vitamine c. Des réponses similaires ont été enregistrées après le traitement à l'extrait brut et à la fraction hexanique de PA, mais la fraction au méthanol de PA n'a pas enregistré une réduction de d'ARNm de HO-1, comme le montre la figure 46 F. La fraction hexanique de PA a enregistré une augmentation significative ($P<0.001$) des niveaux d'ARNm de Nrf-2 qui correspondaient aux niveaux de HO-1 (figure 46 E et F).

Les niveaux d'ARNm de Nrf-2 et de HO-1 se sont avérés être régulés positivement dans les cellules B16F10 à la suite d'une exposition aux UV, comme le montre la figure 47. Une tendance similaire a été observée avec le traitement à la vitamine c, aux fractions hexanique (HM et PA) et méthanol de PA, mais la fraction au méthanol de HM a montré une diminution significative ($P<0.001$) des niveaux d'ARNm Nrf-2 et de HO-1.

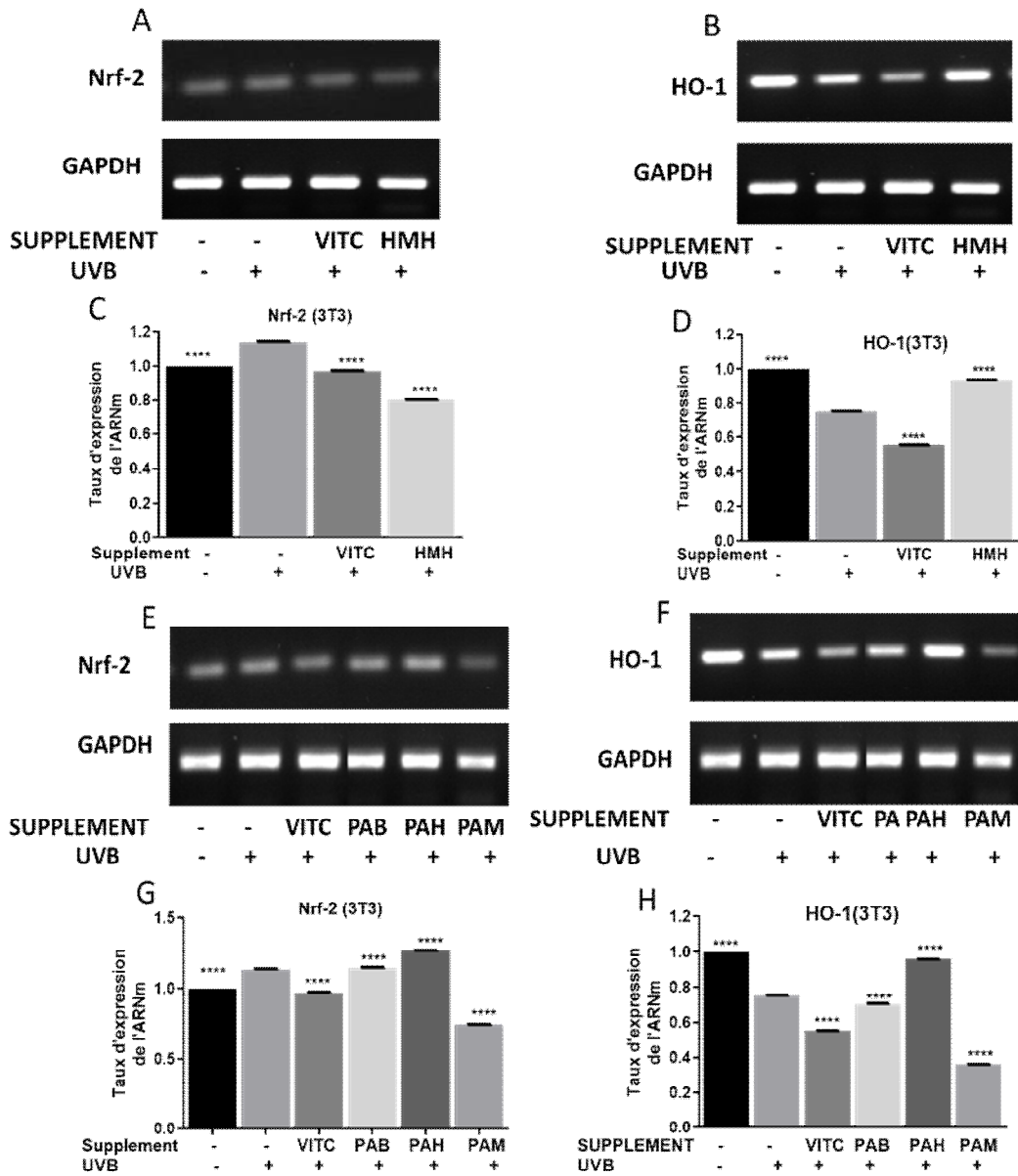


Figure 46 : Taux d'expression de l'ARNm du facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf-2) et de l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans les cellules NIH/3T3 prétraitées par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB

(A, B) et (E, F): gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de Nrf-2 et de HO-1 dans les cellules NIH/3T3 après prétraitées ou non par les fractions de plantes sélectionnées et irradiées ou non par les rayons UVB (29,7 mJ/cm²). (C, D) et (G, H): histogrammes d'analyse densitométrique de l'expression des gènes Nrf-2 et de HO-1 par le logiciel image J. La GAPDH a été utilisé comme témoin interne. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type (n = 3), **** P<0.001 par rapport au groupe exposé aux UVB. Nrf-2, facteur nucléaire érythroïde 2; HO-1: Hème oxygénase-1; GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

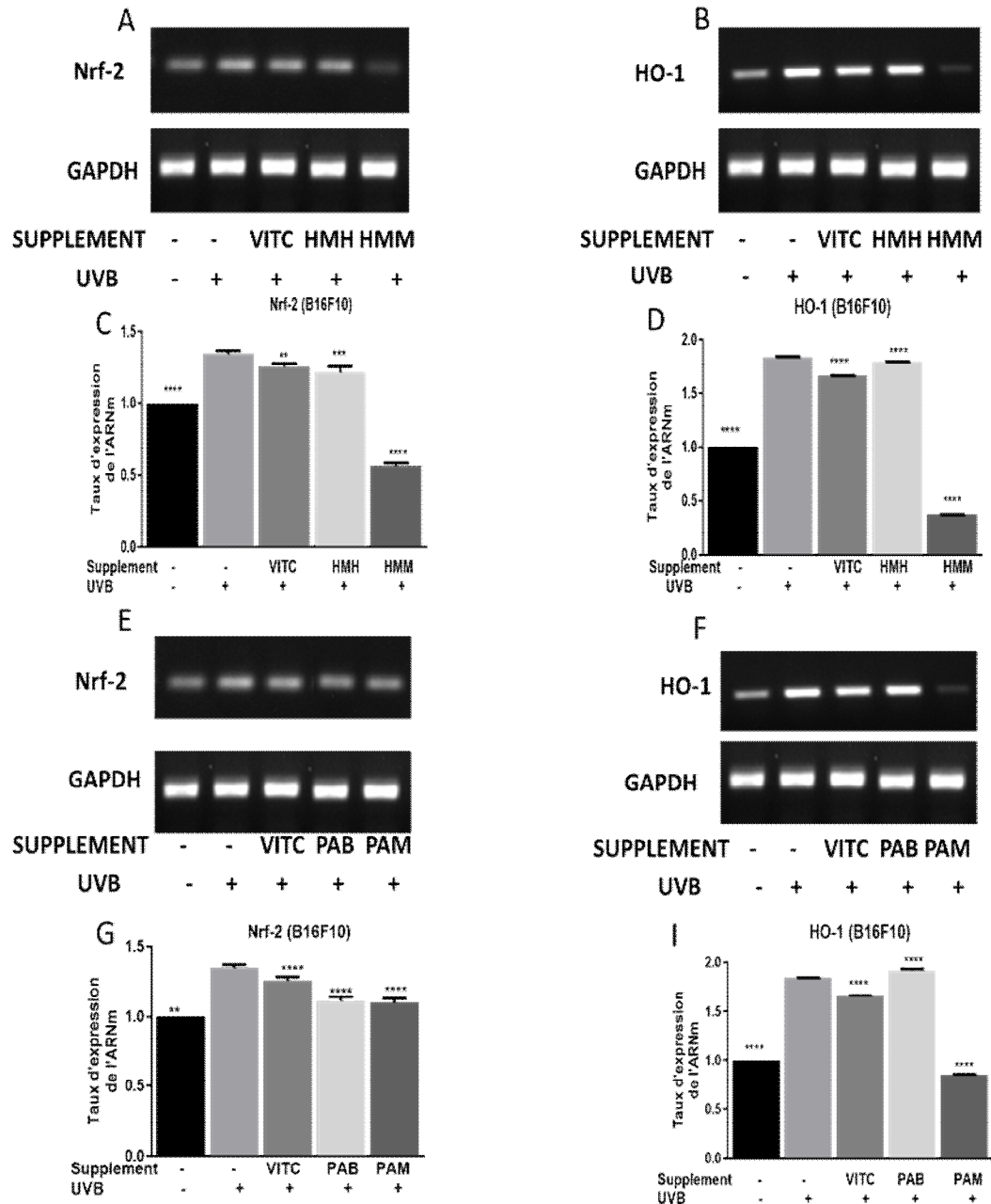


Figure 47 : Taux d'expression de l'ARNm du facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf-2) et de l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans les cellules B16F10 prétraitées par les fractions de plantes et irradiées par les rayons UVB

(A, B) et (E, F) : gels présentant le changement d'expression des ARNm des gènes de Nrf-2 et de HO-1 dans les cellules B16F10 après prétraitées ou non par les fractions de plantes sélectionnées et irradiées ou non par les rayons UVB (29,7 mJ/cm²). (C, D) et (G, H) : histogrammes d'analyse densitométrique de l'expression des gènes Nrf-2 et de HO-1 par le logiciel image J. La GAPDH a été utilisé comme témoin interne. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type. (n = 3), **P<0.01, **** P<0.001 par rapport au groupe exposé aux UVB. Nrf-2 : facteur nucléaire facteur 2 'érythroïde 2; (HO-1) 1: Hème oxygénase-1; GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

III.3.2.2.6- Réduction par les fractions de plantes de la teneur en mélanine induites par UVB dans les cellules B16F10.

Nous avons étudié l'effet des fractions sur la mélanogénèse en utilisant les Cellules B16F10 prétraitées avec la vitamine C ou avec les fractions de plantes suivi de l'exposition aux rayons UVB, inducteurs de la mélanogénèse. Les résultats sont illustrés sur les figures 48 et 49. L'exposition au UVB a entraîné une augmentation du niveau de mélanine dans les cellules B16F10 (figures 48, 49) et le traitement par les fractions de HM a significativement ($P < 0.001$) augmenté la teneur en mélanine cellulaire (figure 49A). Cependant, la teneur totale en mélanine a enregistré une baisse significative ($P < 0.001$) après traitement par les fractions de PA. De même, la couleur des cellules centrifugées s'éclaircit après prétraitement par les fractions de PA par rapport aux cellules exposées aux UVB (figure 49B), indiquant que les fractions hexanique et méthanolique de PA inhibent la synthèse de la mélanine dans les cellules B16F10 suite à une exposition aux UVB.

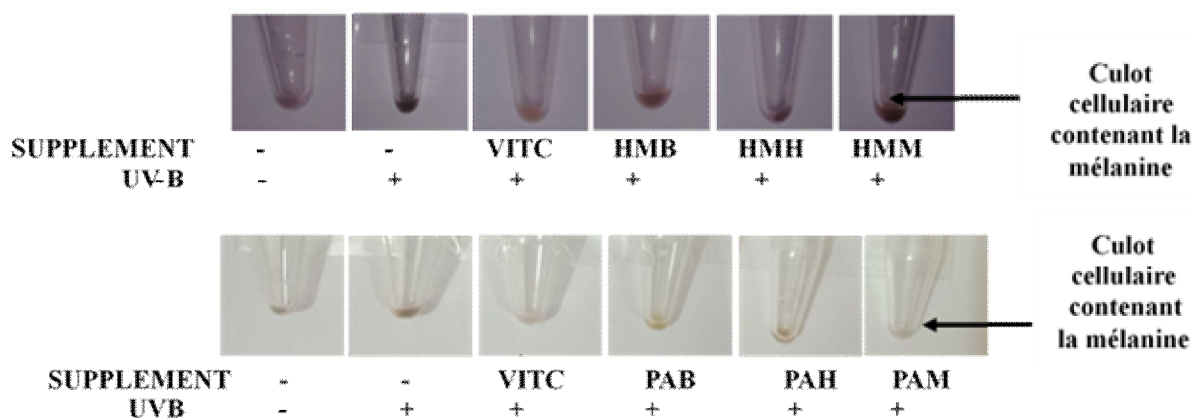


Figure 48 : Photographie des culots des mélanomes B16F10 après prétraitement par les fractions de plantes et irradiation par les rayons UVB

Les cellules B16F10 ont été prétraitées avec les fractions de plantes ou de la vitamine c pendant 1 h et les cellules ont été exposées aux UVB (39,6 mJ/cm²), incubées pendant 24 h supplémentaires et les culots photographiés. HMB : extrait brut de H. madagascariensis; HMH: fraction à l'hexane de H. madagascariensis; HMM: fraction au méthanol de H. madagascariensis; PAB: extrait brut de P. aurantiacum; PAH: fraction à l'hexane de P. aurantiacum; PAM: fraction au méthanol de P. aurantiacum; VITC: vitamine C.

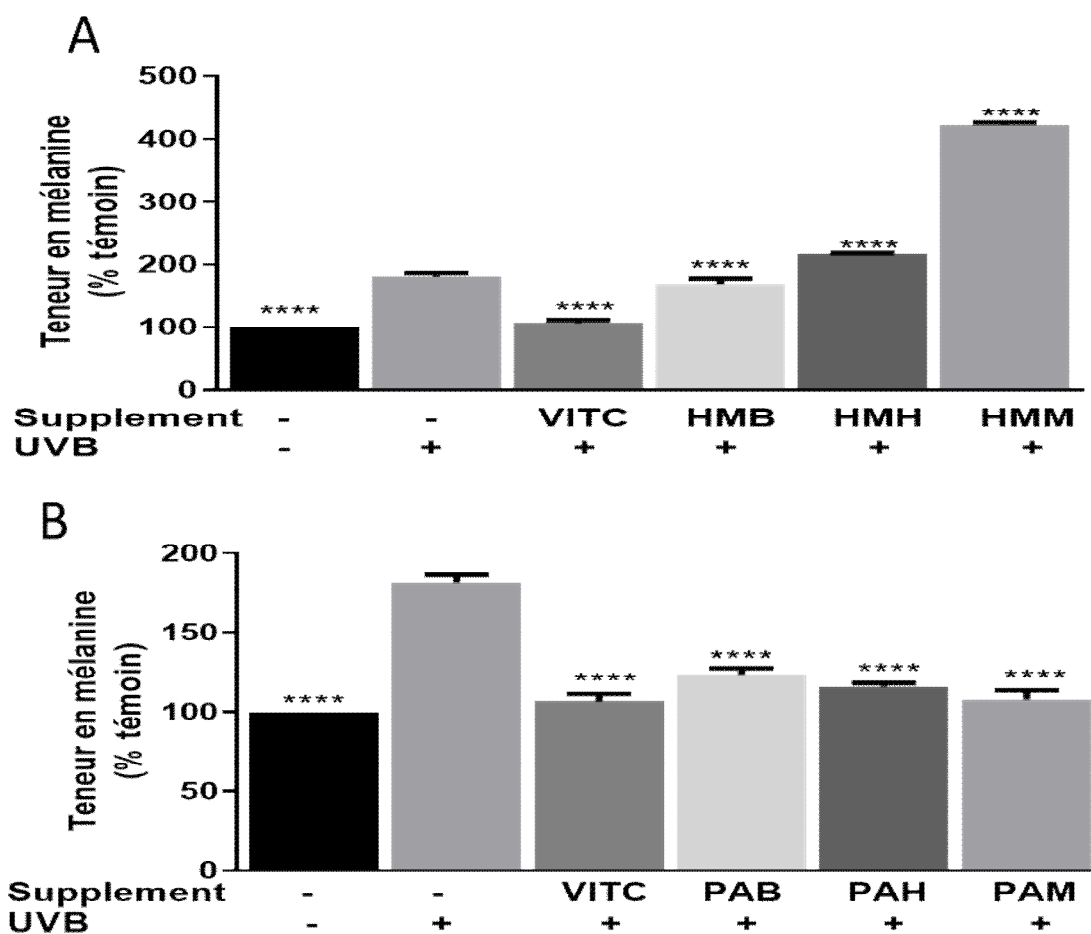


Figure 49 : Taux de mélanine dans les cellules B16F10 après prétraitement par les fractions de plantes et irradiation par les rayons UVB

(A, B) : Les cellules B16F10 ont été prétraitées avec les fractions de plantes ou de la vitamine C pendant 1 h et les cellules ont été exposées aux UVB (39,6 mJ/cm²) pendant 24 h supplémentaires. La teneur en mélanine a été déterminée comme décrit plus haut dans les méthodes. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances (ANOVA) à un facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Dunnett. Les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écart-type. (n = 3), **** P < 0.001 par rapport au groupe exposé aux UVB. GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; HMB: extrait brut de *H. madagascariensis*; HMH: fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*; HMM: fraction au méthanol de *H. madagascariensis*; PAB: extrait brut de *P. aurantiacum*; PAH: fraction à l'hexane de *P. aurantiacum*; PAM: fraction au méthanol de *P. aurantiacum*; VITC: vitamine C.

III.3.3- Conclusion partielle 2

Au terme de cette deuxième partie du travail qui était consacrée à déterminer parmi les fractions sélectionnées des plantes, celles qui protègent les cellules de peau de souris contre le vieillissement cutané dans un modèle induit par les rayonnements UVB, il ressort que :

- les fractions hexaniques et méthanoliques de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* protègent les mélanomes B16F10 et les fibroblastes NIH/3T3 de peau de souris du stress oxydatif intracellulaire induit par les rayonnements UV-B. Les fractions hexanique de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* restaurent le niveau d'ARNm des gènes antioxydant Nrf-2 et HO-1 ;
- les fractions hexanique de *H. madagascariensis* et méthanolique de *P. aurantiacum* protègent les fibroblastes NIH/3T3 de la dégradation du collagène en augmentant le niveau de synthèse de l'ARNm du collagène de type I (COL1A1) et en diminuant celui de l'ARNm de la matrice metalloproteinase-1 (MMP-1) ;
- les fractions hexanique et méthanolique de *P. aurantiacum* protègent les mélanomes B16F10 de la peau de souris en réduisant les niveaux d'ARNm des tyrosinase (TYR) et *tyrosinase related protein-1*(TRP-1) et en diminuant également la teneur en mélanine synthétisé suite à l'exposition aux rayonnement UVB.

Pour la suite de nos travaux, nous avons retenu la fraction hexanique de *H. madagascariensis*, les fractions hexanique et méthanolique de *P. aurantiacum* qui ont protégé les cellules contre les dommages induits par les rayonnements UV-B.

III.4- Profil phytochimique et effets anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase de quelques composés isolés des fractions actives

III.4.1- Profil chimique des fractions actives

✓ Classes des composés chimiques présents dans les fractions actives de plantes (HMH et PAM)

Plusieurs classes de composés phytochimiques : les flavonoïdes, les triterpènes, les tanins, les alcaloïdes, terpenoïdes, les saponines, les stérols, les quinones, et les anthocyanes présentés dans le tableau XI ont été mises en évidence dans les fractions de plantes

Tableau XI: Quelques classes de composés chimiques présentes dans les fractions actives HMH et PAM de plantes

Classe de composés	Fraction hexanique de <i>H. madagascariensis</i>	Fration méthanolique de <i>P. aurantiacum</i>
Polyphénols	+	-
Flavonoïdes	+	+
Alcaloïdes	+	-
Anthocyane	+	-
Coumarines	-	-
Saponines	+	-
Tanins	+	-
Triterpenes	+	+
Quinones	+	-
Triterpenoïdes	+	+

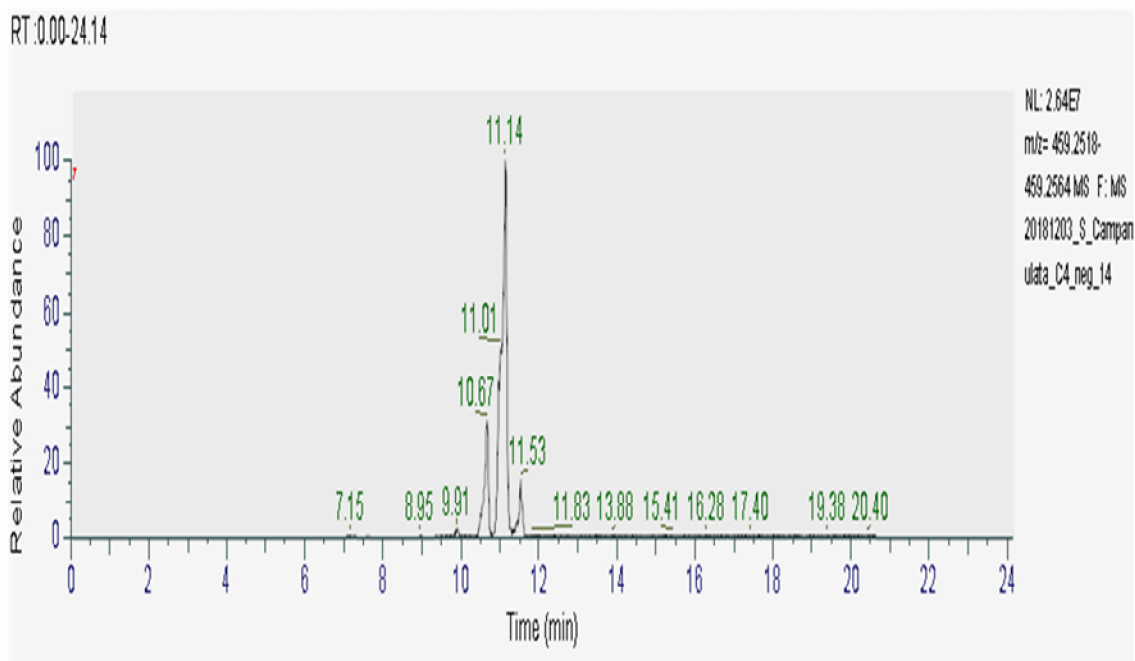
+ = Présence de la classe de composés, - = Absence de la classe de composés

✓ Structures des composés présents dans les fractions de HMH et de PAM

L'analyse des fractions actives de HMH et PAM par CLHP-MS laisse percevoir plusieurs pics avec des temps de rétention et d'intensité variables représentant les différents composés contenus dans ces fractions. Les figures 50 et 51 suivantes illustrent la composition de ces-

fractions. Les temps de rétention des composés ainsi que leurs formules brutes sont regroupés dans le tableau XII.

A



B

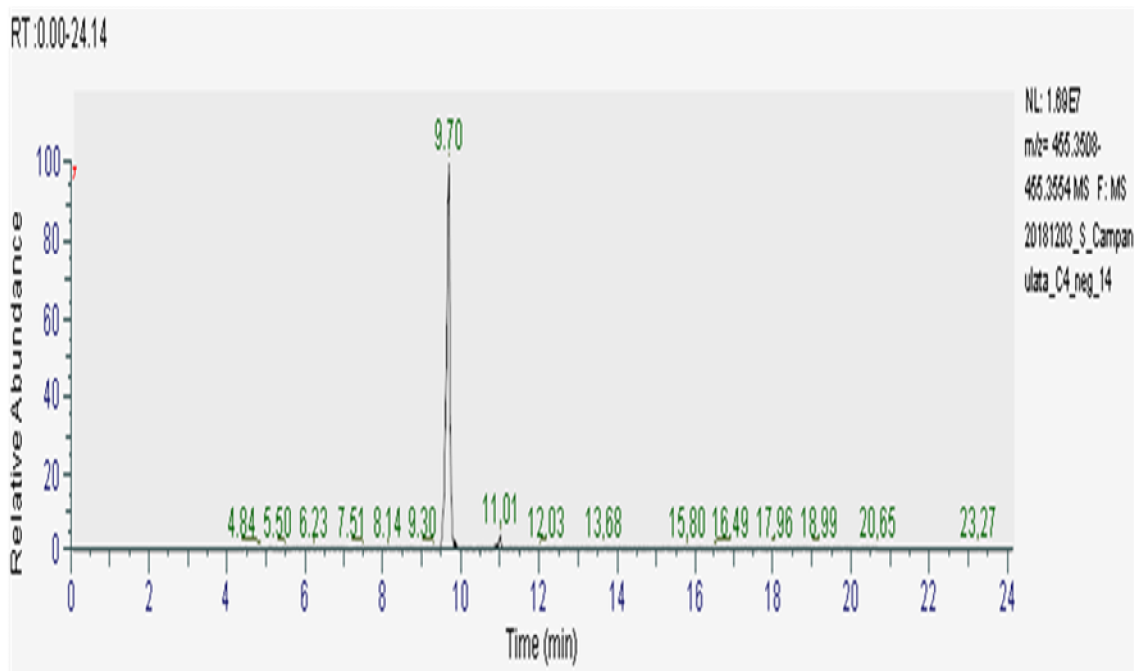


Figure 50 : Chromatogramme HPLC des fractions actives sélectionnées HMH

(A) et (B) : chromatogrammes de la fraction HMH analysées par HPLC-ACN-Stetard-Method. HMH : fraction à l'hexane de *H. madagascariensis*.

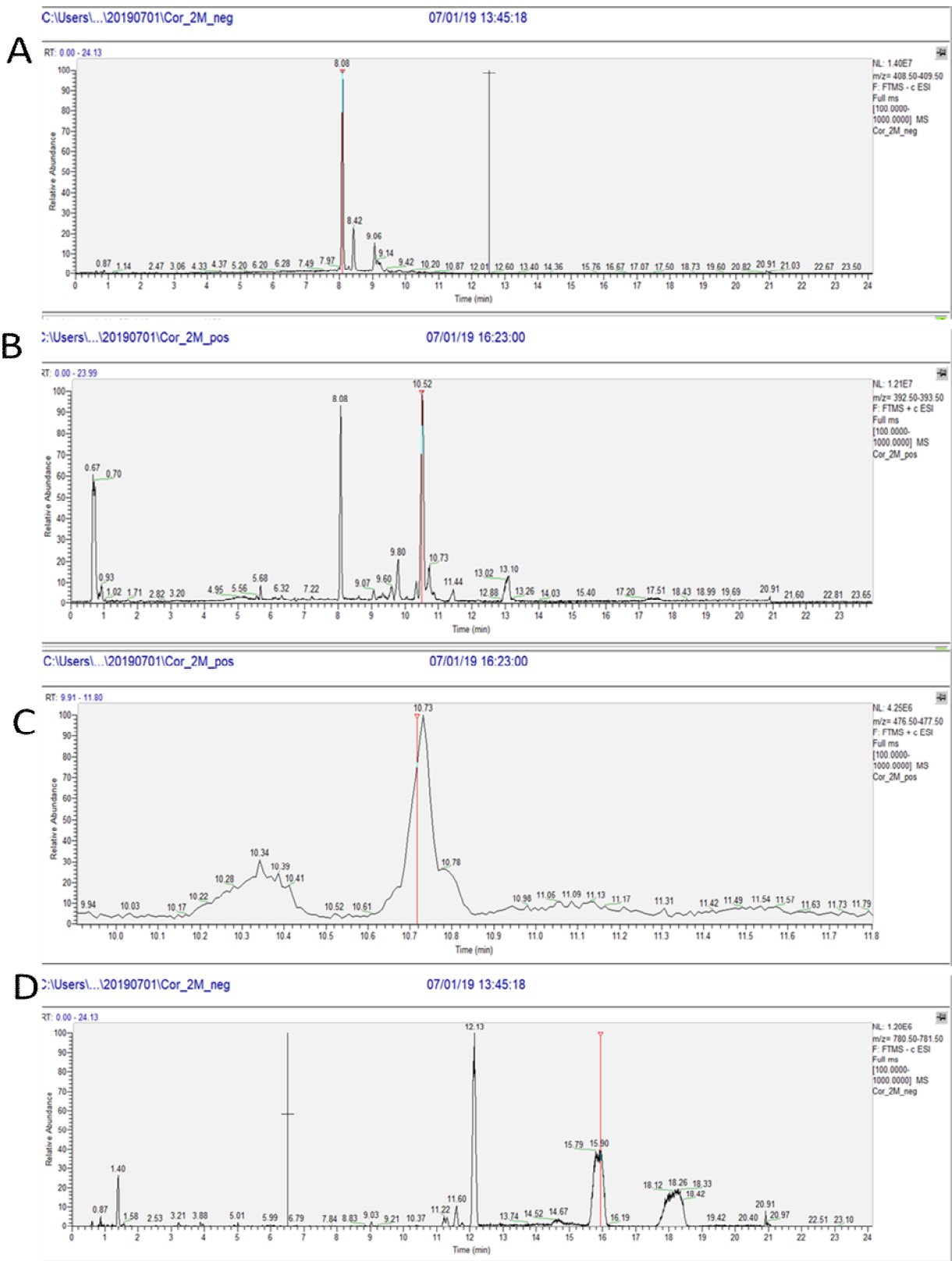


Figure 51 : Chromatogramme HPLC des fractions actives sélectionnées PAM

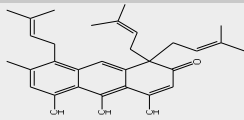
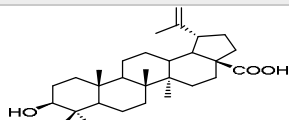
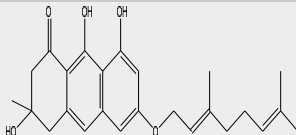
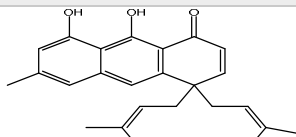
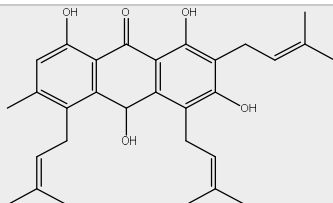
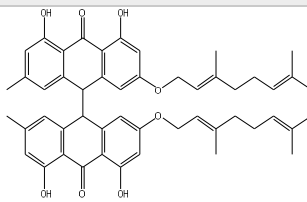
(A), (B), (C), (D) : chromatogrammes de la fraction PAM analysées par HPLC-ACN-Stetard-Method. PAM : fraction au méthanol de *P. aurantiacum*.

Le chromatogramme HPLC de HMH (figure 50 A et B) a montré quatre principaux pics avec des temps de rétention de 9,70, 10,87, 11,14 et 11,53 min. Deux pics 9,70 et 11,14 ont été identifiés comme Harunganine (polyphénol) et acide bétulinique (triterpènes) respectivement. Le chromatogramme HPLC de PAM (figure 51 A, B, C et D) a montré de nombreux pics encore plus complexes avec des temps de rétention variables parmi lesquels quatre ont été identifiés. Le pic le plus élevé a été désigné comme le bianthrone (15,90). Les autres pics, après analyse, correspondent à la vismine (10,52), vismione D (8,08) et kenganthranol B (10,73).

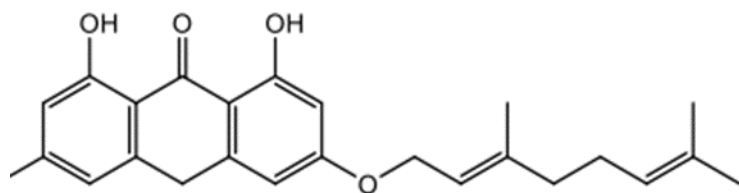
✓ **Composés isolés de la fraction PAH**

Vingt-sept composés ont été isolés par chromatographie sur colonne, désignés de A à Z. La pureté a été vérifiée par chromatographie sur couche mince et la comparaison des spectres des composés par SMHR et RMN (annexe 2) avec les données de la littérature a permis l'identification de trois composés purs connus dénommés 3-géranxyloxyémodinanthrone (Anthrone), 3-géranxyloxyémidine (Anthraquinone) et lupéole (Triterpène) codés respectivement comme composé **M**, composé **S** et composé **E**

Tableau XII : Temps de retention, noms et structures des composés

Fractions	Temps de retention (min)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Formules brutes	Noms et structures des composés
HMH	9,70		455,35	C ₃₀ H ₃₆ O ₄	 <p>Harunganine</p>
	11,14		459,25	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	 <p>Acide bétulinique</p>
PAM	8,08	411,22		C ₂₅ H ₃₀ O ₅	 <p>Vismione D</p>
	10,52	393,21		C ₂₅ H ₂₈ O ₄	 <p>Vismine</p>
	10,73	477,26		C ₃₀ H ₃₆ O ₅	 <p>Kenganthranol B</p>
	15,90		781,37	C ₂₈ H ₁₆ O ₂	 <p>Bianthrone</p>

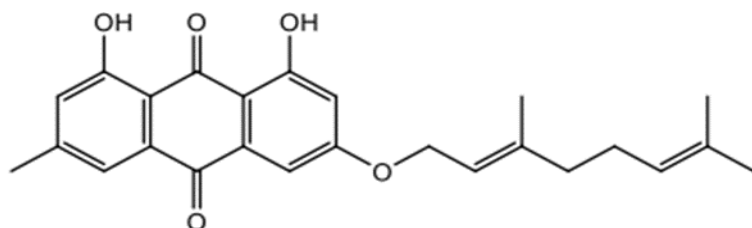
HMH : fraction à l'hexane de *H. madagascariensis* ; *PAM* : fraction au méthanol de *P. aurantiacum*.



(M) : 3-géranyloxyemodinanthrone

2-((E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyloxy)-4,5-dihydroxy-7-méthylanthracen-10(9H)-one

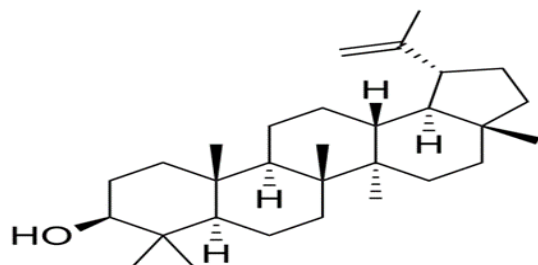
Formule brute : $C_{25}H_{26}O_4$; Masse molaire : 392,49g/mol



(S): 3-géranyloxyémidine

3-[(2E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyloxy]-1,8-dihydroxy-6-méthylanthracène-9,10-dione

Formule brute : $C_{25}H_{26}O_5$; Masse molaire: 406,5g/mol



(E): Lupéole

(1R,3aR,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-3a,5a,5b,8,8,11a-hexaméthyl-1-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,5,6,7,7a,9,10,11,11b,12,13,13a,13b-hexadécahydrocyclopenta[a]chrysen-9-ol

Formule brute : $C_{30}H_{50}O$; Masse molaire : 426,7g/mol

Les autres composés étaient constitués de : A,B,C,D,F,G,H,I,J,K,L,P,Q,R ; mélange de la 3-géranyloxyémodinanthrone et de la 3-géranyloxyémidine, N ; mélange de 3-géranyloxyémodinanthrone et d'un triterpène, V ; mélange du lupéole et d'un autre triterpène, O, T ; mélange de xanthone et d'alcool d'acide gras, U ; mélange complexe d'antraquinone et Z ; mélange de xanthone triterpène et anthraquinone.

III.4.2- Effets anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase des composés isolés de la fraction PAH

III.4.2.1- Effet anti-élastase des composés isolés de PAH

III.4.2.1.1- Interactions entre le site actif de l'élastase et les composés isolés

L'étude de l'interaction entre les résidus d'acides aminés du site actif de l'élastase du porc et les différents composés a été réalisée. La formation d'un complexe stable dépend de la fixation de l'inhibiteur au niveau du site actif. Les différentes figures présentées ci-dessous montrent la meilleure fixation des différents inhibiteurs au niveau du site actif de l'enzyme.

a-) Interaction avec la 3-géranyloxyémodinanthrone (M)

L'analyse visuelle du complexe (figure 52) ne nous révèle pas de liaisons hydrogènes entre la 3-géranyloxyémodinanthrone (M) et les résidus d'acides aminés présents au niveau du site actif de l'élastase. La molécule est stabilisée par des interactions hydrophobes formées par les résidus d'acides aminés His 200, Ser 29, Pro 28, Trp 27, Gln 119, Leu 114, Tyr 207, Val 122 et Leu120 du site actif de l'élastase

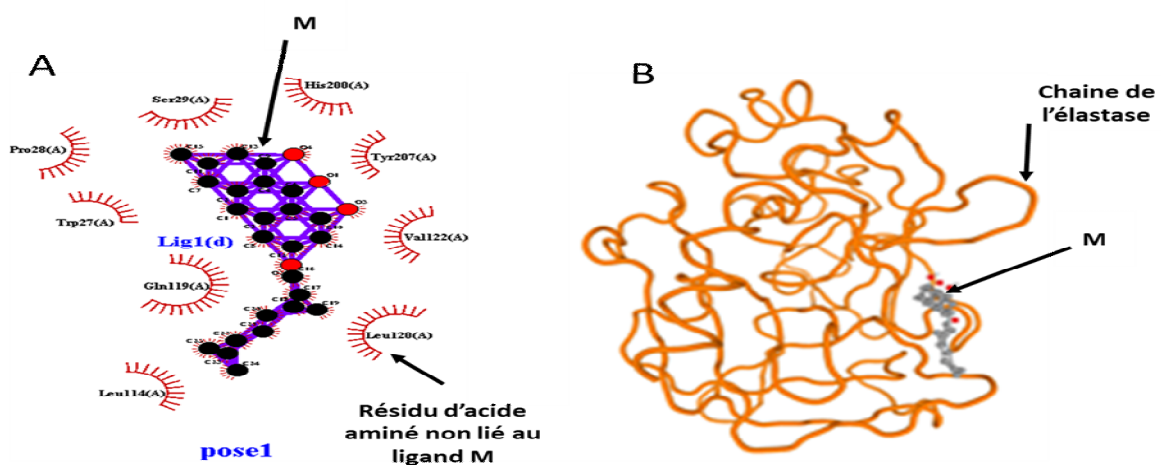


Figure 52 : Mode de liaison de la 3-géranyloxyémodinanthrone (M) avec le site actif élastase

(A): interactions entre l'élastase et M; (B): structure 3D de l'élastase et de M, M: 3-géranyloxyémodinanthrone, Lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec M,

b-) Interaction avec la 3-géranyloxyémidine (S)

Le complexe nous révèle quatre liaisons hydrogènes, entre le groupement C13-OH de 3-géranyloxyémidine (S) et le groupement amine de His 57, le groupement carboxylique de la Ser 195, l'oxygène de la Ser 214 et le groupement amine de la Val 216. La molécule

également stabilisé par des interactions hydrophobes formées par les résidus d'acides aminés Cys191A, Gln 192A, The 215A, Val 199, Trp 172, Arg 217A du site actif de l'élastase (figure 53).

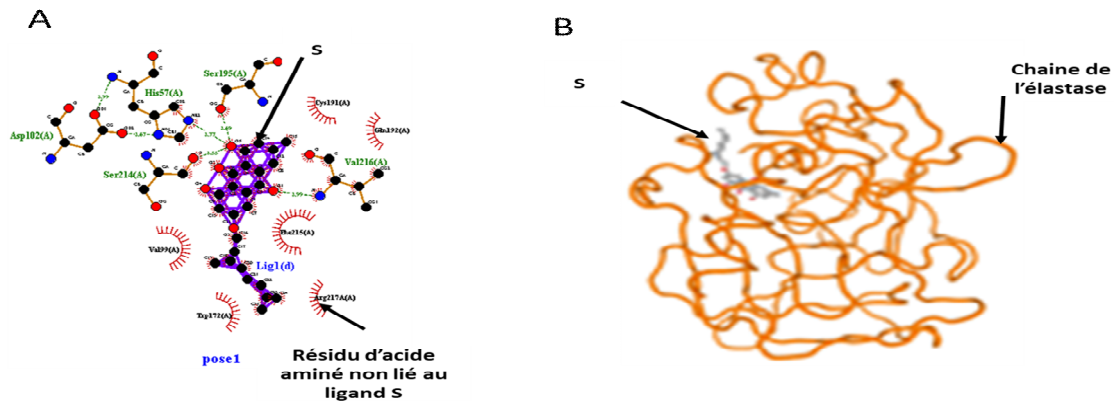


Figure 53 : Mode de liaison de la 3-géranyloxyémidine (S) avec le site actif de l'élastase

(A): interactions entre l'élastase et S; (B): structure 3D de l'élastase et de S, (S): 3-géranyloxyémidine, Lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec S, tandis que les liaisons hydrogènes sont représentées par des lignes pointillées vertes.

c-) Interaction avec le lupéole (E)

Le complexe nous révèle deux liaisons hydrogène entre le groupement C9-OH du lupéole (E) et le groupement carboxylique et aminé de la Val 216 (figure 54). La molécule est aussi stabilisée par les interactions hydrophobes des résidus : Asp 60, Val 99, Phe 215, His 67, Arg 61, Tyr 96, Asn 214 du site actif de l'élastase.

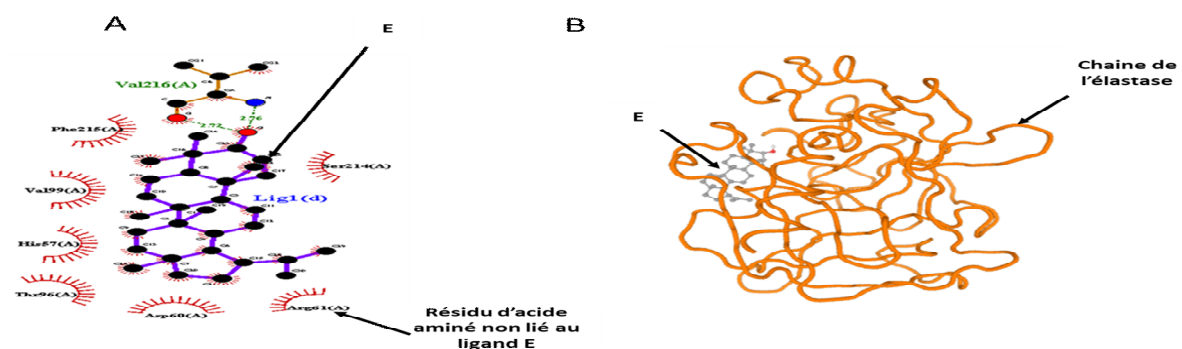


Figure 54 : Mode de liaison du lupéole (E) avec le site actif de l'élastase

(A): interactions entre l'élastase et E; (B): structure 3D de l'élastase et de E, (E): lupéole, Lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec E, tandis que les liaisons hydrogènes sont représentées par des lignes pointillées vertes.

III.4.2.1.2- Interactions entre le facteur de transcription AP-1 et les composés isolés

L'étude de l'interaction entre les résidus d'acides aminés du facteur de transcription *Activator protein-1* (AP-1) et les différents composés a été réalisée.

a-) Interaction avec la 3-géranyloxyémodinanthrone (M)

Nous observons deux liaisons hydrogènes entre l'oxygène des carbones 16 et 17 de la 3-géranyloxyémodinanthrone (M) et les groupements amines des résidus d'acides aminés Ala 133 et Ala131 du facteur AP-1, La molécule est stabilisée par les interactions hydrophobes des résidus d'acides Ser 154, Val 150, Met 15, Ser 132, Leu 127, Ser 129, Thr 131, Gly 152 (figure 55).

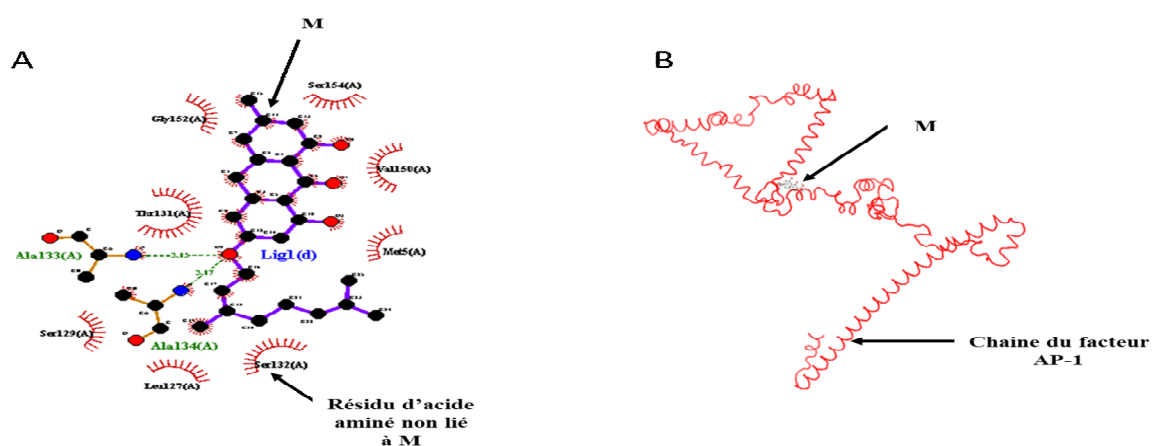


Figure 55 : Mode de liaison de la 3-géranyloxyémodinanthrone (M) avec le facteur de transcription AP-1

(A): interactions entre AP-1 et M; (B): structure 3D de l'AP-1 et de M, lig: ligand, (M): 3-géranyloxyémodinanthrone, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec E, tandis que les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillées vertes.

b-) Interaction avec la 3-géranyloxyémodin (S)

La figure 56 qui suit nous révèle une liaison hydrogène entre le C-OH du carbone 26 de la 3-géranyloxyémodin (S) et le groupement carboxylique de Gln 204. La molécule est stabilisée par les interactions hydrophobiques des résidus d'acide, Phe 211, Gln 213, Phe 194, Gln 207, Phe 219, Phe 218 du facteur AP-1.

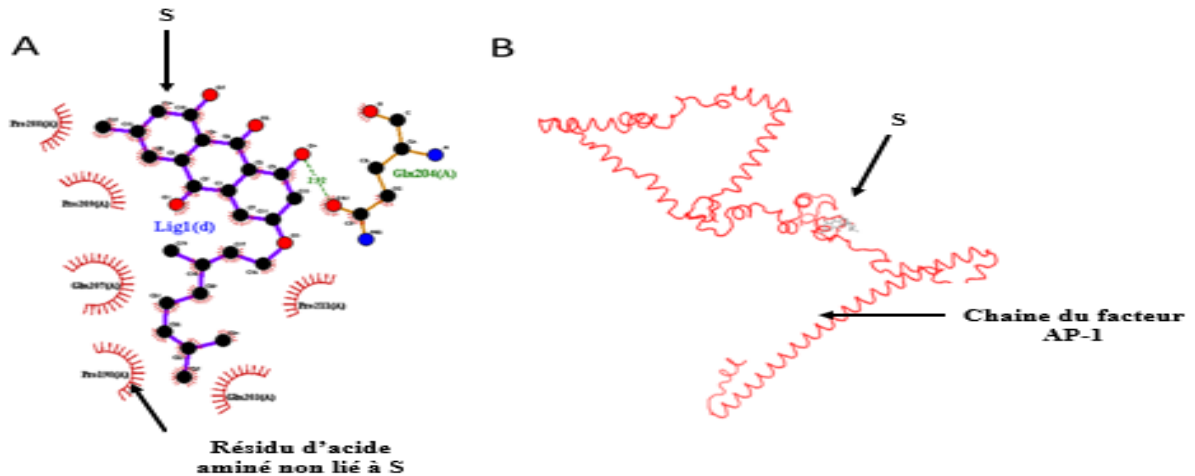


Figure 56 : Mode de liaison de la 3-géranyloxyémidine (L2) avec le facteur de transcription AP-1

(A): interactions entre AP-1 et L2; (B): structure 3D de AP-1 et de L2, lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec E, tandis que les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillées vertes.

c-) Interaction avec le lupéole (E)

Le lupeole (E) est stabilisé par des interactions hydrophobes formées par les résidus d'acides aminés Ser 194, Gln203, Gln 21, Phe 112, Phe 114, His 211, Ile 210 du site actif du facteur de transcription AP-1 (figure 57).

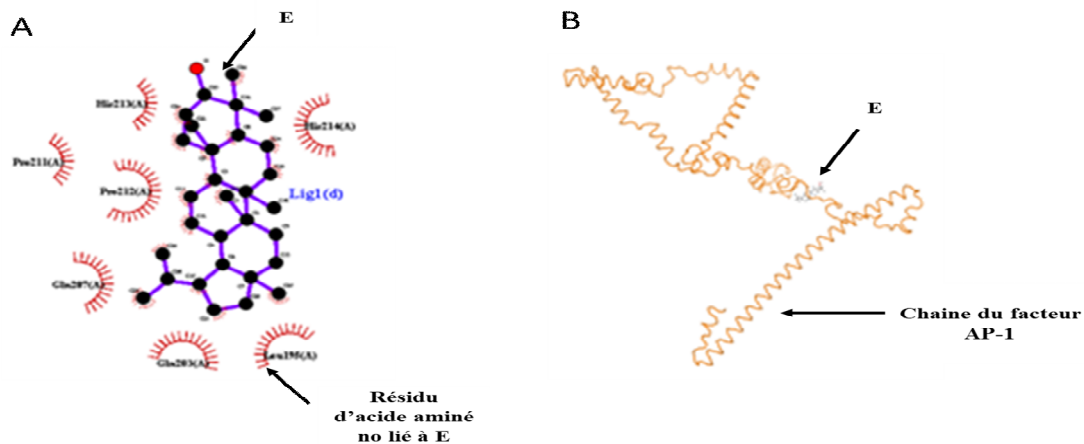


Figure 57 : Mode de liaison du lupéole (E) avec le facteur de transcription AP-1

(A): interactions entre AP-1 et E; (B): structure 3D de AP-1 et de E, lig: ligand, (E): lupéole, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec E.

III.4.2.1.3- inhibition de l'activité de l'élastase *in vitro*

Les tests *in vitro* ont été réalisés en utilisant l'élastase purifié du porc. Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés à 100 et 10 µg/mL. Tous les composés ont

présenté une bonne activité inhibitrice sur l'élastase considérable (inhibition supérieure à 50%) à 10 µg/mL sauf le composé S comme indiqué par la figure 58. Le composé E (88.09%) a présenté un pourcentage d'inhibition de l'élastase le plus élevé à 10 µg/mL par rapport aux autres composés et mélange de composés.

Les énergies de liaisons des différents complexes élastase- composés formés ont été calculées. Les résultats des tests anti-élastase ont été regroupés dans le tableau XIII. Les résultats de cette étude montrent que les énergies des complexes élastase-M et elastase-S sont respectivement -7,42Kcal/mol et -7,3Kcal/mol alors que celle du complexe elastase-E est plus basse et elle est de -12,83Kcal/mol. Aucune différence n'a été observée entre les énergies de liaisons des complexes formés par les composés et le facteur de transcription AP-1.

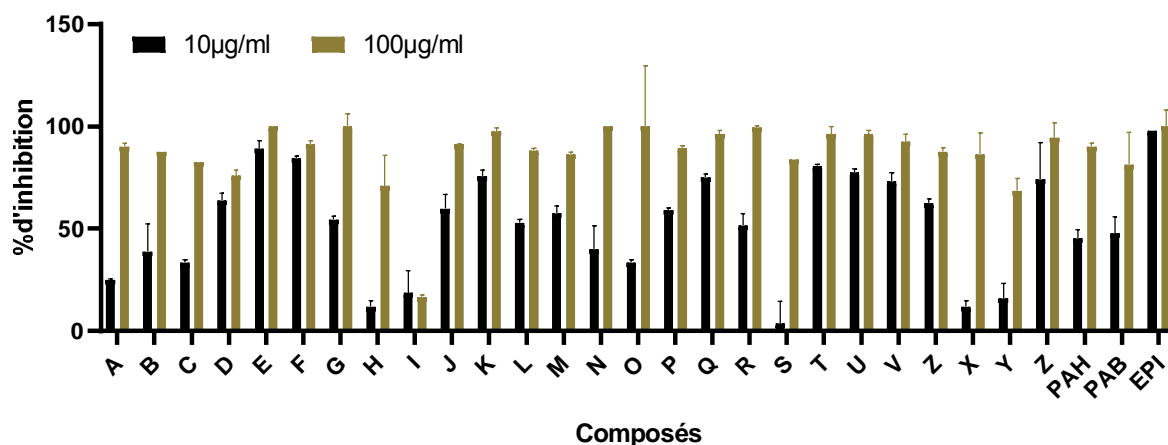


Figure 58 : Inhibition de l'élastase par les composés aux concentrations 10 et 100 µg/mL

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type (n=3). A,B,C,D,F,G,H,I,J,K,L,M,P,Q,R: mélange de la 3-géranyloxyémodinanthrone et de la 3-géranyloxyémodine; E: lupéole; M: 3-géranyloxyémodinanthrone; S: 3-géranyloxyémodine; N: mélange de 3-géranyloxyémodinanthrone et d'un tri terpène; V: mélange du lupéole et d'un autre tri terpène; O, T: mélanges de xanthone et d'alcool d'acide gras; U: mélange complexe d'anthraquinone; Z: mélange de xanthone tri terpène et anthraquinone; PAB: P. aurantiacum extrait brut; PAH: P. aurantiacum fraction a l' hexane; EPI: Epigallocachetingallate

Tableau XIII: Activité anti-élastase des composés

Composés	Structures	Interactions avec l'élastase	Energie de liaison élastase (Kcal /mol)	%inhibition de l'élastase à (10µg/mL)	Interactions avec AP-1	Energie de liaison avec AP-1 (Kcal /mol)
(M)		8 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes	-7,42	72,42 ± 0.35	8 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes; 2 résidus d'aa impliqués: dans les liaisons H	- 6,49
(S)		4 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes 3 résidus d'aa impliqués: dans les liaisons H	-7,30	3,78 ± 0.30	6 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes interaction, 1 résidus d'aa impliqués: dans les liaisons H:	-6,94
(E)		8 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes; 2 résidus d'aa impliqués: dans les liaisons H	-12,83	88,09 ± 0,10	7 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes:;	6,37
Epi				98,09 ± 7,90		

M: 3-géranyloxyémodinanthrone; S: 3-géranyloxyémidine; E: Lupéole; Epi: Epigallocatechingallate

III.4.2.2- Inhibition de la 15-lipoxygénase par les composés isolés de PAH

III.4.2.2.1-Interactions entre le site actif de la 15-lipoxygénase et les composés isolés

a-) Interaction avec la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M)

La 3-géranxyloxyémodinanthrone (M) est stabilisée par les interactions hydrophobes des résidus d'acide aminés Ile325, Leu 266, Ile 267, Val 322, Ser 269, ILE 323, Gln 704 du site actif de la lipoxygénase (figure 59).

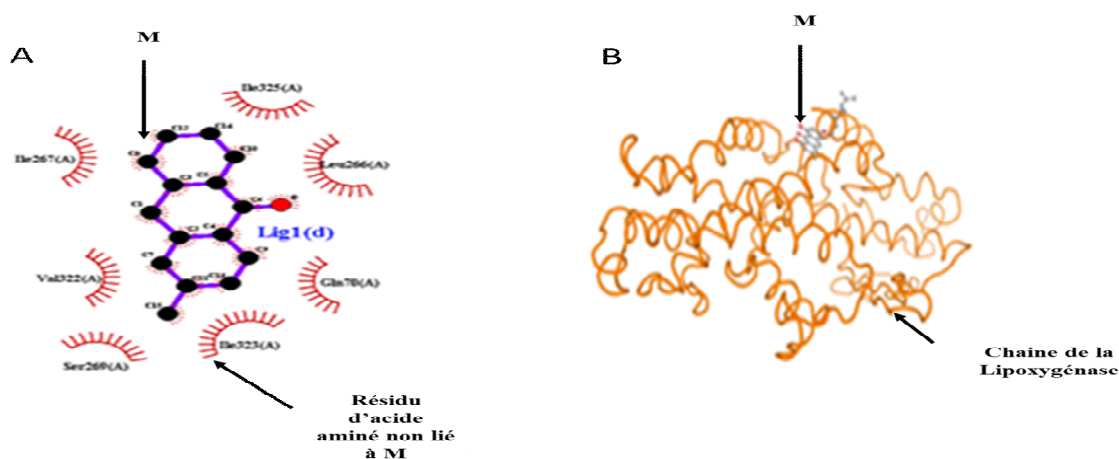


Figure 59 : Mode de liaison de la 3-géranxyloxyémodinanthrone (M) avec le site actif de la lipoxygénase

(A): interactions entre la lipoxygénase et M; (B): structure 3D de de la lipoxygénase et de M, (M): 3-géranxyloxyémodinanthrone, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec M.

b-) Interaction avec la 3-géranxyloxyémidine (S)

L'analyse visuelle du complexe nous révèle une liaison hydrogène entre le groupement C-OH du carbone 17 de la 3-géranxyloxyémidine (S) et le groupement amine de His (3-géranxyloxyémidine -C-OH...NH-His). La molécule est également stabilisée par des interactions hydrophobes des résidus Val 112 A, Leu 173A, Val 212, Phe 113, Gln 71A, Met 154A (figure60).

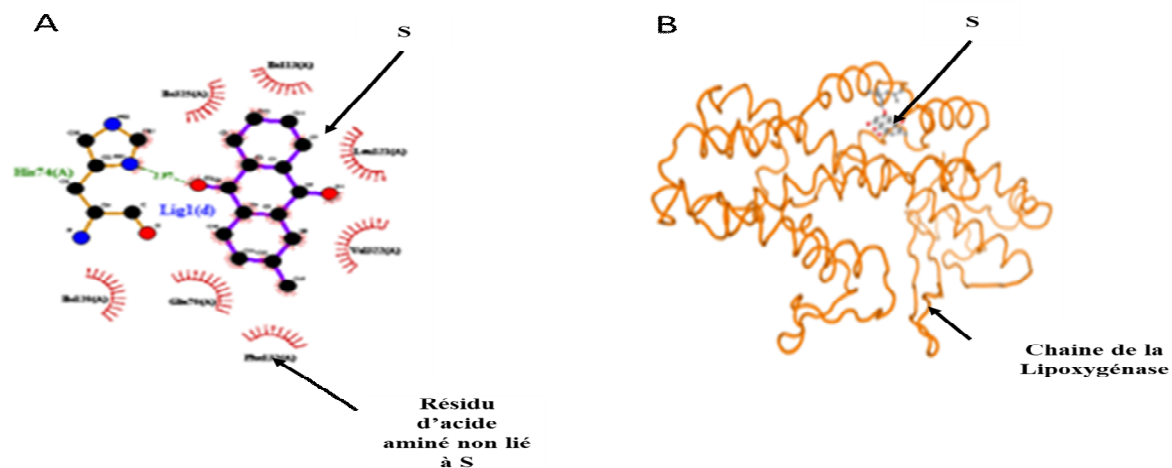


Figure 60 : Mode de liaison de la 3-géranyloxyémodine (S) avec le site actif de la lipoxygénase

(A): interactions entre lipoxygénase et S; (B): structure 3D de la lipoxygénase et de S, (S): 3-géranyloxyémodine lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec S, tandis que les liaisons hydrogènes sont représentées par des lignes pointillées vertes.

c-) Interaction avec le lupéole (E)

Le complexe nous révèle qu'il n'y a pas de liaisons hydrogènes entre le lupéole (E) et le site actif de la lipoxygénase (figure 61), La molécule est stabilisée par des interactions hydrophobes des résidus d'acides aminés Gln 264 , Phe 112 , Asp 150 , Leu 15, Tyr 181, Tyr 183 du site actif de la lipoxygénase.

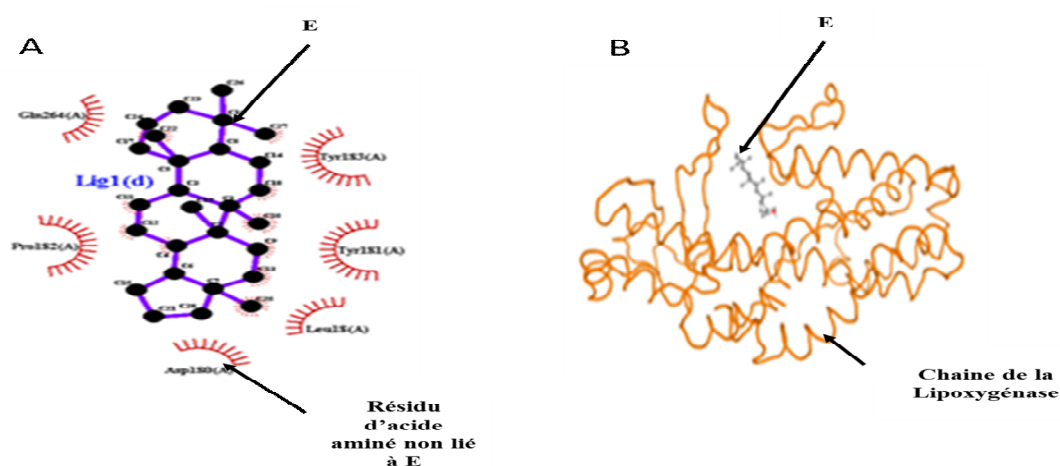


Figure 61 : Mode de liaison du lupéole (E) avec le site actif de la lipoxygénase

(A): interactions entre lipoxygénase et E; (B): structure 3D de la lipoxygénase et de E, (E): lupéole, lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec E.

III.4.2.2.- Interactions entre le facteur de transcription NFkB et les composés isolés

a-) Interaction avec 3-géranyloxyémodinanthrone (M)

La 3-géranyloxyémodinanthrone (M) est stabilisée par des interactions hydrophobes des résidus des acides aminés Gln 170, Leu 172, His 173, Gly 206, His 172, Ser 174, Gln 177, Thr 169, Leu 205 du site actif du facteur NFkB.

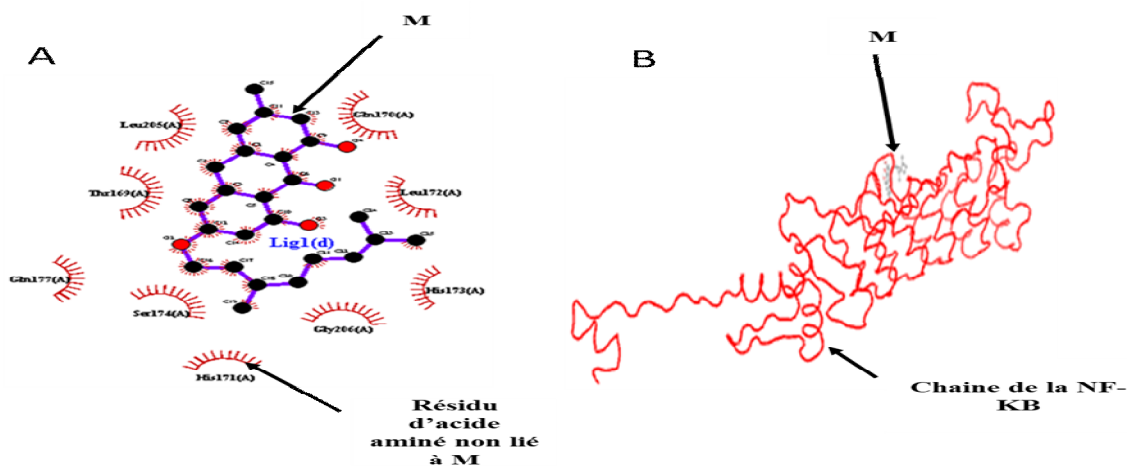


Figure 62 : Mode de liaison de la 3-géranyloxyémodinanthrone (M) avec le facteur de transcription NFkB

(A): interactions entre NFkB et M; (B): structure 3D de la NFkB et de M, (M): 3-géranyloxyémodinanthrone, lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec M.

b-) Interaction avec 3-géranyloxyémidine (S)

Nous observons une liaison hydrogène entre le groupement C-OH de la 3-géranyloxyémidine (S) et le groupement carboxylique de His (3-géranyloxyémidine -C-OH...NH-His). La molécule est aussi stabilisée par des interactions hydrophobes des résidus des acides aminés Gly 168, Asp 136, Pro 137, His 171, Leu 172, Ile 175, Ser 174 (figure 63).

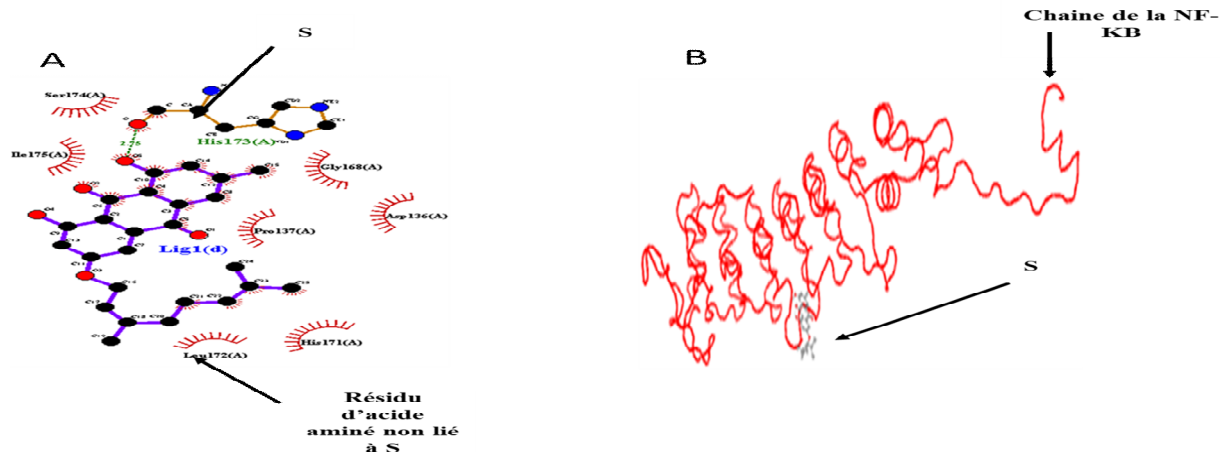


Figure 63 : Mode de liaison de la 3-géranyloxyémidine (S) avec le facteur de transcription NFκB

(A): interactions entre l'NFκB et S; (B): structure 3D de NFκB et de S, (S): 3-géranyloxyémidine, lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus d'acides aminés établissant des contacts non liés avec S, tandis que les liaisons hydrogènes sont représentées par des lignes pointillées vertes.

c-) Interaction avec le lupéole (E)

L'analyse visuelle du complexe nous révèle deux liaisons hydrogène entre le groupement C-OH du lupéole et le groupement carboxylique de Asp 242, entre le groupement C-OH du lupéole et le groupement amine de Val 243. La molécule est aussi stabilisée par des interactions hydrophobes des résidus des acides aminés Ala 241, Leu 272, Ser 234, Leu 237, Lys 238, Gly240, Asn 244 (figure 64).

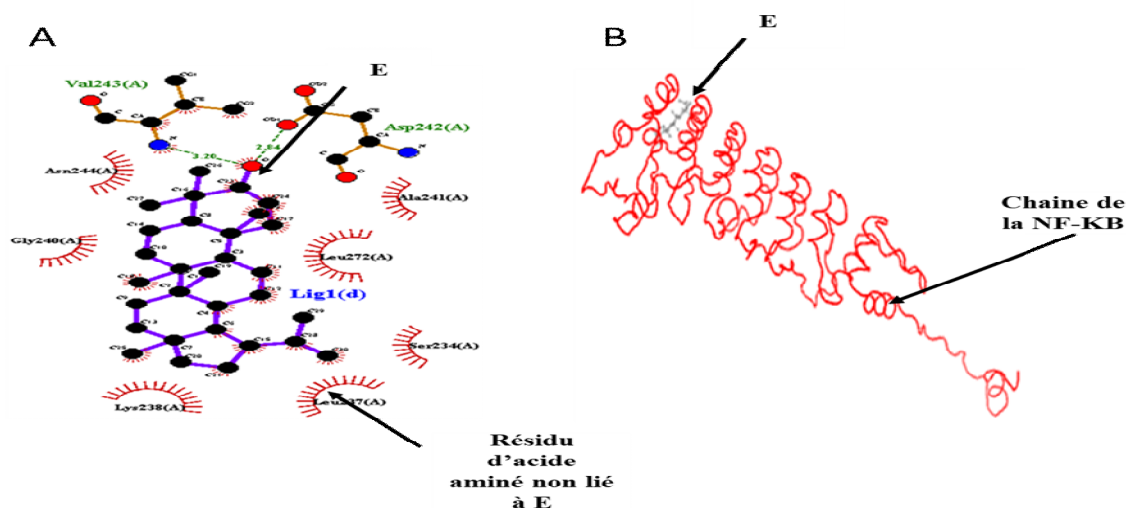


Figure 64 : Mode de liaison du lupéole (E) avec le facteur de transcription NFκB.

(A): interactions entre NFκB et E; (B): structure 3D de NFκB et de E, (E): lupéole, lig: ligand, les arcs à rayons représentent les résidus établissant des contacts non liés avec E, tandis que les liaisons hydrogènes sont représentées par des lignes pointillées vertes.

III.4.2.2.3- inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase *in vitro*

Les tests *in vitro* ont été réalisés en utilisant la lipoxygénase purifié du soja. Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés. D'une manière générale, le pourcentage d'inhibition de la 15-lipoxygénase augmente avec la concentration en composés ce qui n'a pas été le cas pour certains composés (E, K, L, N, O, P, Q, R, S et T). Le pourcentage d'inhibition de tous les composés varie de 0,00 à 100% et les valeurs obtenues sont présentées dans la figure 65. La 3-géranxyloxyémodinanthrone (M) a présenté une bonne activité inhibitrice anti 15- LOX avec une CI_{50} de $35.35 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$.

Les énergies des complexes lipoxygénase-M et lipoxygénase -E sont respectivement -7,92 Kcal/mol et -7,44 Kcal/mol alors que celle du complexe lipoxygénase-S est plus basse et elle est de -8,98 Kcal/mol. Le composé S inhibe mieux la lipoxygénase que les composés M et E car, il forme le complexe le plus stable avec la lipoxygénase. On n'observe aucune différence significative entre les énergies de liaison des complexes formés par les composés et le facteur de transcription NF κ B. Les CI_{50} et les énergies de liaisons des différents complexes lipoxygénase- composés formés sont présentés dans le tableau XIV suivant.

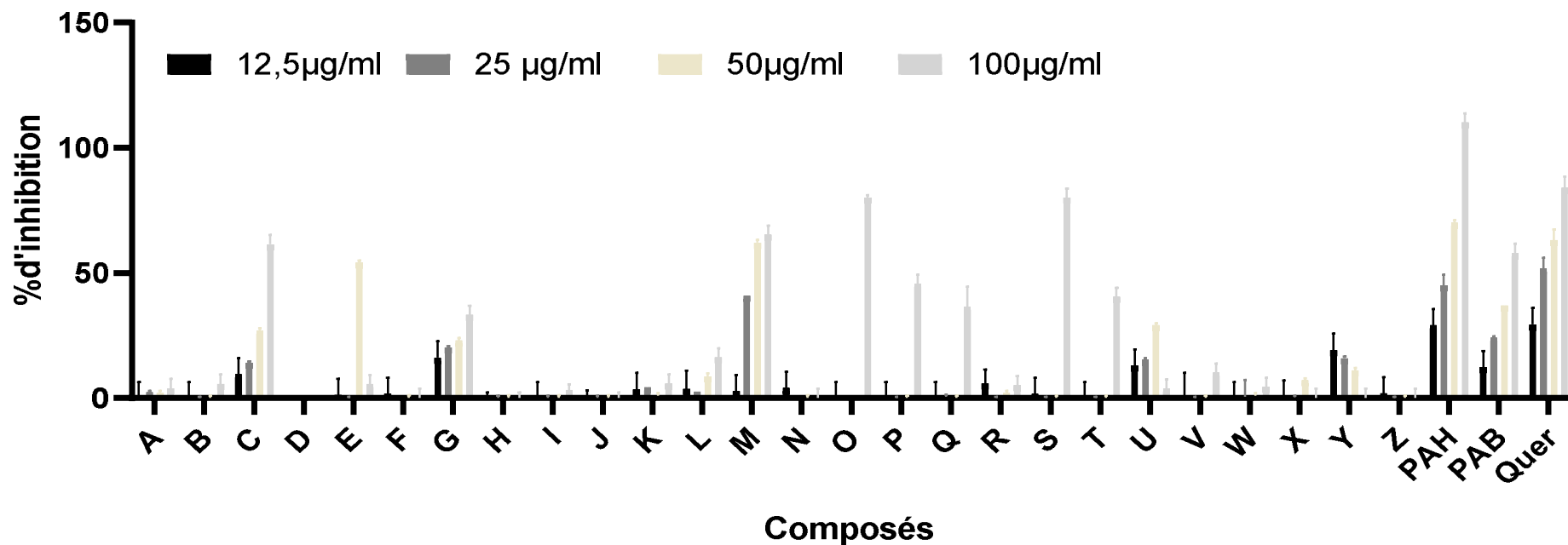
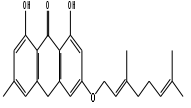
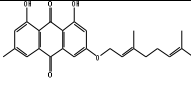
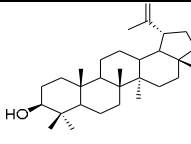
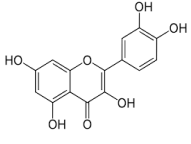


Figure 65 : Inhibition de la 15-lipoxygénase par les composés à différentes concentrations

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type (n=3), A,B,C,D,F,G,H,I,J,K,L,M,P,Q,R: mélange de la 3-géranyloxyémodinanthrone et de la 3-géranyloxyémodine; E: lupéole; M: 3-géranyloxyémodinanthrone; S: 3-géranyloxyémodine; N: mélange de 3-géranyloxyémodinanthrone et d'un tri terpène; V: mélange du lupéole et d'un autre tri terpène; O, T: mélanges de xanthone et d'alcool d'acide gras; U: mélange complexe d'anthraquinone; Z: mélange de xanthone tri terpène et anthraquinone; PAB: *P. aurantiacum* extrait brut; PAH: *P. aurantiacum* fraction à l'hexane; EPI: Epigallocachetingallate

Tableau XIV: Activité anti-lipoxygénase des composés

Composés	Structures	Interaction avec LOX	Energie de liaison avec LOX (Kcal /mol)	LOX (%I 50µg/mL)	LOX (%I 100µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	Interaction avec NF-KB	Energie de liaison avec NF-KB (Kcal /mol)
(M)		7 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes;	-7,92	62,99 ±3,75	65,19 ±3,75	35,35 ±0,35	9 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes	-6,35
(S)		8 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes; 1 résidu d'aa impliqué dans les liaisons H	-8,98	0±1,20	80,04 ±3,73	NA	8 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes; 2 résidus d'aa impliqué dans les liaisons H	-6,84
(E)		6 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes	-7,44	54,28 ±3,75	5,52 ±3,75	NA	7 résidus d'aa impliqués dans les interactions hydrophobes; 2 résidus d'aa impliqué dans	-6,76
Quer				63,12 ±3,75	84,12 ±3,75	26,79 ±3,97		

M : 3-géranyloxyémodinanthrone; S: 3-géranyloxyémodine; E: Lupéole; LOX: Lipoxygénase; Quer: Quercetin; %I: pourcentage d' inhibition

III.4.2.3- Inhibition de la tyrosinase par les composés isolés de PAH

Tous les composés ont été testés à une concentration unique de 100 µg/mL ainsi que la vitamine C (témoin positif). Les pourcentages d'inhibition variaient de 8 à 100% (figure 66). Les composés ayant présentés au moins 50% d'inhibition ont été sélectionnés pour mener des expériences afin d'évaluer les relations concentration-activité (figure.67). La 3-géranyloxyémodinanthrone (M) a présenté une activité concentration-dépendante avec une CI₅₀ de 65,00 µg/mL significativement ($p < 0,05$) différente de celle de la vitamine C (48,85 µg/mL). Les valeurs des CI₅₀ sont présentées dans le tableau XV.

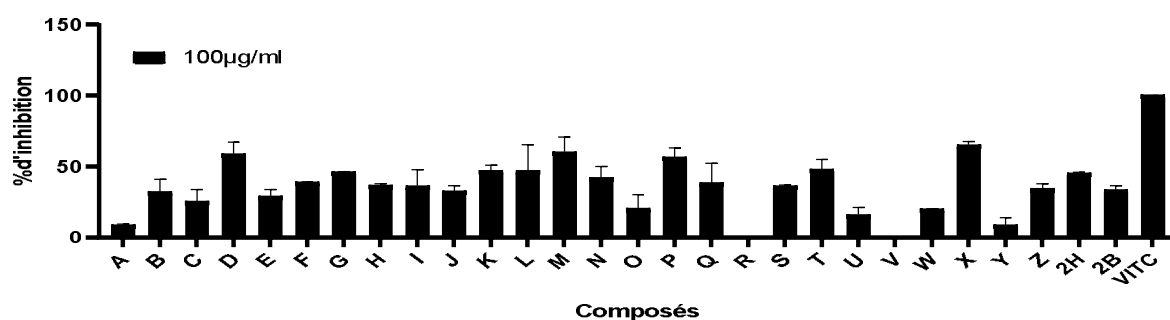


Figure 66 : Inhibition de la tyrosinase par les composés aux concentrations de 100µg/mL

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3), A,B,C,D,F,G,H,I,J,K,L,M,P,Q,R: mélange de la 3-géranyloxyémodinanthrone et de la 3-géranyloxyémidine; E: lupéole; M: 3-géranyloxyémodinanthrone; S: 3-géranyloxyémidine; N: mélange de 3-géranyloxyémodinanthrone et d'un tri terpène; V: mélange du lupéole et d'un autre tri terpène; O, T: mélanges de xanthone et d'alcool d'acide gras; U: mélange complexe d'antraquinone; Z: mélange de xanthone tri terpène et anthraquinone ;PAB: P. aurantiacum extrait brut; PAH: P. aurantiacum fraction a l' hexane; VIT C; vitamine C

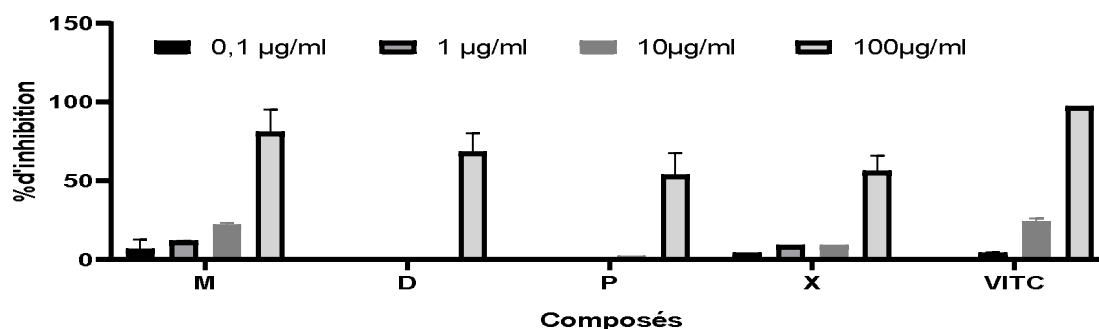


Figure 67 : Inhibition de la tyrosinase par les composés à différentes concentrations

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3), D, P, X: mélange de la 3-géranyloxyémodinanthrone et de la 3-géranyloxyémidine; M: 3-géranyloxyémodinanthrone;PAB: P. aurantiacum extrait brut; PAH: P. aurantiacum fraction a l' hexane; VIT C; vitamine C.

Tableau XV: Valeurs des IC₅₀ des composés pour l'inhibition de la tyrosinase

composés	CI₅₀ (µg/ml)	CI₅₀ (mol/ml)
M	65,00 ± 7,60 ^b	16,6 10 ⁻⁸
X	78,25 ± 0,15 ^b	19,94 10 ⁻⁸
Vitamine C	41,85 ± 1,25 ^a	-

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3); Dans une même colonne, les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes (p<0,05). M, 3-geranyloxyemodinanthrone ; X ; mélange de la 3-geranyloxyemodinanthrone et de la 3-geranyloxyemodine ; VIT C; vitamine C

III.4.2.4- Inhibition de la production du NO

L'accumulation de nitrite, un produit oxydé stable du NO, a été mesurée dans des milieux de culture des cellules de macrophages RAW 264,7 activés par LPS. Les niveaux de nitrites dans les cellules stimulées par le LPS ont augmenté par rapport aux cellules témoins, les quantités en nitrites produites en présence des différentes fractions à 100 µg/mL sont représentées dans le tableau XVI. Le pourcentage de viabilité des cellules RAW 264,7 à 100 µg/mL a considérablement varié entre 0 et 86%. Certains composés ont inhibé la production de NO de manière concentration dépendante. Le lupéole a inhibé de manière significative (p <0,05) la production de NO avec une concentration inhibitrice (IC₅₀) de 35,74 ± 0,05µg/mL par rapport à la quercétine (15,13 ± 0,25 µg/mL), les résultats sont regroupés dans le tableau XVI suivant :

Tableau XVI: Inhibition du nitric oxide produit par les macrophages activé (RAW264.7) par les composés ainsi que leur viabilité cellulaire

Composés	NO (μM)	% I de production du NO ($100 \mu\text{g/mL}$)	% viabilité ($100 \mu\text{g/mL}$)	Production du NO CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
A	3,24 \pm 0,20	15,27 \pm 2,17	64,36 \pm 0,05	> 100
B	2,49 \pm 0,04	23,32 \pm 0,42	84,87 \pm 6,79	> 100
C	6,13 \pm 0,27	0 \pm 2,93	53,75 \pm 3,66	> 100
D	3,26 \pm 0,22	17,58 \pm 1,10	76,28 \pm 0,96	> 100
E	0,74 \pm 0,01	80,12 \pm 1,12	79,47 \pm 2,84	28,74 \pm 0,05 ^b
F	4,51 \pm 0,30	2,69 \pm 0,40	74,52 \pm 0,06	> 100
G	1,56 \pm 0,01	36,07 \pm 0,01	78,87 \pm 7,03	> 100
H	ND	ND	1,40 \pm 0,40	ND
I	2,36 \pm 0,01	24,65 \pm 0,07	82,41 \pm 0,64	> 100
J	4,22 \pm 0,04	4,74 \pm 0,42	71,29 \pm 7,67	> 100
K	2,43 \pm 0,08	23,96 \pm 0,91	71,43 \pm 7,03	> 100
L	3,78 \pm 0,02	9,54 \pm 0,21	61,25 \pm 6,36	> 100
M	ND	ND	1,51 \pm 9,35	ND
N	3,96 \pm 0,26	55,59 \pm 4,02	69,22 \pm 6,39	45,14 \pm 0,21 ^b
O	3,66 \pm 0,09	58,78 \pm 5,07	70,27 \pm 6,18	35,74 \pm 0,11 ^b
P	2,09 \pm 0,21	26,45 \pm 0,53	74,31 \pm 0,12	> 100
Q	1,74 \pm 0,04	30,44 \pm 1,73	88,46 \pm 7,21	> 100
R	2,91 \pm 0,04	17,33 \pm 2,67	62,47 \pm 8,91	> 100
S	ND	ND	0,86 \pm 0,19	ND
T	1,14 \pm 0,19	76,73 \pm 0,66	70,68 \pm 5,75	30,04 \pm 0,01 ^b
U	4,23 \pm 0,20874	10,50 \pm 0,16	80,85 \pm 0,24	> 100
V	4,75 \pm 0,03	9,32 \pm 0,65	57,12 \pm 1,95	> 100
W	2,75 \pm 0,02	58,78 \pm 5,07	70,08 \pm 11,24	> 100
X	5,02 \pm 0,35	8,75 \pm 0,05	55,17 \pm 2,96	> 100
Y	13,65 \pm 0,64	0,0 \pm 2,97	79,50 \pm 8,97	> 100
Z	ND	ND	17,16 \pm 1,42	ND
QUER	0,74 \pm 0,19	86,72 \pm 3,56	67,24 \pm 6,72	15,13 \pm 0,25 ^a

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type ($n=3$), les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes ($p<0,05$). ND: Non Déterminé; A,B,C,D,F,G,H,I,J,K,L,M,P,Q,R: mélange de la 3-géranyloxyémodinanthrone et de la 3-géranyloxyémidine; %I :pourcentage d'inhibition; E: lupéole; M: 3-géranyloxyémodinanthrone; S: 3-géranyloxyémidine; N: mélange de 3-géranyloxyémodinanthrone et d'un tri terpène; V: mélange du lupéole et d'un autre tri terpène; O, T: mélanges de xanthone et d'alcool d'acide gras; U: mélange complexe d'antraquinone; Z: mélange de xanthone tri terpène et anthraquinone ;PAB: P. aurantiacum extrait brut; PAH: P. aurantiacum fraction a l' hexane; Quer: Quercetine

III.4.3- Conclusion partielle 3

Au terme de cette partie de notre étude les résultats obtenus montrent que :

- la fraction hexanique de *H. madagascariensis* est constituée d'un mélange d'harunganine et acide bétulinique. La fraction méthanolique de *P. aurantiacum* est un mélange de bianthrone, vismin, vismione D et kenganthranol B. Trois composés connus ont été isolés de la fraction hexanique de *P. aurantiacum* : la 3-géranxyloxyémodinanthrone, la 3géranxyloxyémodine et le lupéole ;
- le lupéole et la 3-géranxyloxyémodine forment les complexes les plus stables avec les enzymes élastase et lipoxygénase respectivement, et aucun de ces composés n'interagit avec les facteurs de transcription AP-1 et NF-KB;
- le lupéole possède une activité inhibitrice sur l'élastase et la production de NO par les macrophages activés *in vitro* ; la 3-géranxyloxyémodinanthrone inhibe la tyrosinase et la 15-lipoxygénase *in vitro*.

III.5- Discussion

Malgré les avancées dans le domaine de la dermatologie et de la cosmétologie qui offrent une large gamme variée des produits pour les soins de la peau, les désordres cutanés liés au vieillissement de la peau demeurent un problème de santé publique particulièrement en Afrique Subsaharienne (**Kourouma et al., 2016**). La recherche des nouveaux ingrédients d'origine naturelle, pour leur efficacité compétitive et leurs effets toxiques réduits, continue de connaître une forte croissance dans le monde (**Cavinato et al., 2017**).

Harungana madagascariensis (HM) et *Psorospermum aurantiacum* (PA) sont deux plantes médicinales utilisées pour le soin de la peau et ont été étudiées pour leur propriété anti-âge cutané *in vitro*. Les extraits bruts de ces plantes ont démontré des propriétés antioxydante et inhibitrice de l'élastase et de la tyrosinase, deux enzymes impliqués dans le mécanisme du vieillissement cutané (**Manjia, 2012**). Le but principal de l'étude a été de déterminer l'effet des fractions des deux plantes sur quelques aspects biochimiques du vieillissement cutané à savoir : le stress oxydatif, l'inflammation, la surproduction de la mélanine, et la dégradation du collagène. Les résultats obtenus ont démontré l'action protectrice de la fraction hexanique de *H. madagascariensis* et des fractions hexanique et méthanolique de *P. aurantiacum* évaluée d'une part par la détermination de leurs potentiels antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase ; et d'autre part, par leur aptitude à protéger les cellules de la peau contre les dommages induits par les rayonnements UVB, un des facteurs inducteur du vieillissement cutané.

Les facteurs externes (rayons UV, tabac, alcool) sont la principale cause de la production des radicaux libres et du stress oxydatif qui sont fortement impliqués dans le mécanisme du vieillissement de la peau (**Mathen et al., 2014; Negi et al., 2012**). Au cours du vieillissement cutané, les activités des enzymes (tyrosinase, élastase et collagénase) augmentent d'une part, les enzymes (lipoxigénase et cyclooxygénase) et les cellules inflammatoires (macrophages) sont aussi activées d'autre part (**Hulya Celik Onar, 2012; Lin et al., 2017**). Plusieurs composés tels que l'acide ascorbique, l' α -tocophérol et l'acide alpha-lipoïque reconnus comme des puissants antioxydants et remplacent la matrice extracellulaire (collagène, élastine et l'acide hyaluronique) sont généralement utilisés dans les formulations, mais ont un spectre d'action limité et la controverse dans leur efficacité a été soulevée en raison de leur incapacité à pénétrer la peau et de leur instabilité (**Kim et al., 2011; Taofiq et al., 2016**).

La première partie de notre étude a été consacrée à la recherche des fractions des plantes possédant à la fois un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase.

L'activité antioxydante *in vitro* des plantes montre leur potentiel à protéger les constituants des cellules de la peau tels que les lipides, l'ADN et les protéines contre les dommages oxydatifs induits par le stress oxydatif pouvant se produire *in vivo* lors de la génération de radicaux délétères comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochlorique, radical hydroxyle, l'oxyde nitrique et oxygène singulet (Fu *et al.*, 2011). Le stress oxydatif est un processus complexe qui engage les radicaux libres, les enzymes de dégradation, les facteurs de régulation et le modèle expérimental ne peut être décrit par une seule méthode (Fu *et al.*, 2011). Il est donc essentiel d'utiliser plusieurs méthodes pour étudier l'activité antioxydante d'un extrait de plante (Blažeković *et al.*, 2010). Dans cette étude, nous avons évalué *in vitro* celle qui engage les radicaux libres en étudiant deux activités : l'aptitude de nos fractions à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) et à piéger le radical DPPH°.

Le piégeage du radical DPPH est une méthode simple et rapide généralement utilisé comme test de criblage des composés (Kumar *et al.*, 2008). Le DPPH° est un radical libre qui peut accepter un électron ou un atome d'hydrogène provenant d'un composé donneur pour devenir une molécule stable. Toutes les fractions de plantes testées ont piégé le DPPH° et, la fraction méthanolique de *P. aurantiacum* ($22,29 \cdot 10^{-9} \pm 0,05$ mol de DPPH/μg d'extrait) a présenté un fort pouvoir antiradicalaire (tableau VII). Le pouvoir réducteur des composés sert d'indicateur significatif du potentiel antioxydant (Rao *et al.*, 2010). Ainsi, pour évaluer cette propriété des fractions de plantes, nous avons mesuré leur capacité à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Les fractions méthanolique et hexanique de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum* ont montré les capacités de réduction les plus élevées, comme le montre leur absorbance respective : 0,350 et 0,295 lesquelles sont supérieures à l'absorbance de la vitamine C = 0,290 (figure 24). Toutefois, la capacité de ces fractions à piéger le DPPH° suggère qu'elles sont riches en molécules capable de donner un électron ou de l'hydrogène. Cette suggestion est confortée par la présence dans la fraction méthanolique de *P. aurantiacum* (bianthrone, kengathranol) et dans la fraction hexanique de *H. madagascariensis* (harunganine, acide bétulinique), des composés possédant dans leurs structures de base un système aromatique stabilisé par résonance qui leur confère une capacité de céder les électrons en présence d'un accepteur (Hein *et al.*, 2002, Pietta, 2000). De plus, la présence

des groupements hydroxyles serait responsable de leur activité chélatrice des ions ferriques. Plusieurs études ont montré que l'activité chélatrice des composés augmentait avec le nombre et la position des groupements hydroxyles (**Hein et al, 2002, Pietta, 2000**). Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Tchakam et al. (2012)** et par **Moronkola et al. (2018)** qui ont également étudié le potentiel antioxydant des feuilles de *P. aurantiacum* et des écorces de *H. madagascariensis* et ont trouvé des CI_{50} plus élevées que les nôtres. Ceci s'expliquerait peut-être par le fait que dans leurs études ils ont utilisé l'éthanol et le méthanol comme solvant d'extraction alors que nous avons utilisé le système chlorure de méthylène/méthanol. Le lieu de récolte des plantes aussi diffère ce qui influencerait la composition chimique des extraits utilisés. Les extraits utilisés dans ce travail contiendraient plus de composés antioxydants.

L'élastine est le composant principal des fibres élastiques, elle fait partie des protéines de la matrice extracellulaire qui confère l'élasticité aux tissus conjonctifs. L'élastase est une protéase à serine capable de dégrader toutes les protéines principales de la matrice du tissu conjonctif, y compris l'élastine, le collagène, les protéoglycanes et les kératines. Cette dégradation a pour conséquence une diminution de l'élasticité de la peau, facteur important de plusieurs maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques et les rhumatoïdes qui surviennent lors du vieillissement cutané (**Hulya Celik Onar, 2012**). De même, la tyrosinase est une enzyme qui catalyse deux étapes limitantes de la synthèse de la mélanine à savoir l'étape de la conversion de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) et celle de l'hydroxylation de DOPA en DOPAquinone. Cependant, une activation de la tyrosinase provoquée par une exposition aux rayons ultraviolets ou aux espèces oxygénées réactives (EOR) entraîne une mélanogénèse et des troubles de la pigmentation de la peau. Ainsi, l'inhibition de l'ensemble de ces enzymes (élastase et tyrosinase) est importante pour prévenir ou atténuer tous ces désordres du vieillissement cutané (**Kim et al., 2011**).

Les fractions ont été testées pour leur effet inhibiteur sur l'élastase et la tyrosinase. Parmi toutes les fractions étudiées, il a été constaté que les fractions méthanolique et hexanique de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum* inhibaient fortement les deux enzymes, comme en témoignent leurs pourcentages d'inhibition respectifs 95 et 98% pour l'élastase ; 45 et 48% pour la tyrosinase (figures 30 et 32). Des triterpènes pentacyclique tels que le lupéole et acide bétulinique ainsi que des composés riches en groupement hydroxyle (harunganine, vismine, vismione D, bianthrone, la 3-géranyloxyémodinanthrone et kengathranol) ont été identifiés (tableau XII) dans ces fractions. Etant donné que ces

composés sont reconnus comme des inhibiteurs de l'élastase et de la tyrosinase (**Manosroi et al., 2010a; Sultana et Lee, 2007b**), on peut penser qu'ils interagissent avec les sites actifs de ces enzymes et contribuent en partie à l'action inhibitrice de ces derniers (**Facino et al., 1995**). De plus, la 3-géranyloxyémodinanthrone ($65,00 \pm 7,60 \mu\text{g/mL}$) isolée de la fraction PAH a mieux inhibé la tyrosinase avec une activité significativement ($p < 0,05$) inférieure à celle de la vitamine C ($41,85 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$). Comparée aux activités anti-élastase et anti-tyrosinase des extraits de *Distylium racemosum* étudié par **Ko et al. (2011)**, celle de la fraction hexanique de PA est plus élevée car les CI_{50} développées sont plus faibles.

L'inflammation est impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies, dont le vieillissement de la peau et, les macrophages sont connus comme faisant partie des principaux acteurs des réponses inflammatoires (**Lin et al., 2017**).

Au cours du processus inflammatoire, ces cellules sont activées et produisent un certain nombre de médiateurs inflammatoires, dont le radical d'oxyde nitrique (NO) qui, aux concentrations physiologiques, est vasodilatateur, et joue un rôle important dans le maintien des fonctions de barrière de la peau (**Cals-Grierson et Ormerod, 2004; Mendes et al., 2012**). Cependant, une surproduction de NO est cytotoxique (**Yim et al., 2018**). En outre, la 15-lipoxygénase dégrade les acides linoléique et arachidonique, qui sont des composants importants de la couche épidermique de la peau pour former des éléments pro-inflammatoires tel que l'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque et l'acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque (**Lin et al., 2017**). Par conséquent, l'inhibition de la production de NO produit par les macrophages est souvent utilisée pour cibler l'activité anti-inflammatoire des médicaments (**Suga et al., 2009**). De même, l'inhibition de la dégradation de l'acide linoléique et de l'acide arachidonique représentent une stratégie thérapeutique pour la prévention de l'inflammation de la peau **Lin et al., 2017**).

Dans notre étude, la capacité des fractions à inhiber la production de NO dans des cellules RAW 264.7 stimulées par des LPS a été évaluée, ainsi que leur activité inhibitrice de la 15-lipoxygénase. L'effet inhibiteur de la production du NO des fractions n'était pas dû à leur cytotoxicité, comme l'indiquent les résultats du test de viabilité (figure 26). La fraction hexanique d'HM (CI_{50} de $65,55 \mu\text{g/mL}$) a fortement inhibé la production de NO induite par le LPS dans les cellules (tableau VIII). La plupart des fractions des deux plantes ont inhibé l'activité de la 15-lipoxygénase et la fraction hexanique de PA (CI_{50} de $27,55 \mu\text{g/mL}$) a présenté l'effet inhibiteur le plus élevé (tableau IX). La fraction hexanique d'HM a inhibé à la

fois la production de NO et l'activité de la 15-lipoxygénase. Par conséquent, on peut penser que cette fraction possède un bon potentiel anti-inflammatoire qui serait dû à la présence, dans cette fraction, des triterpènes pentacycliques tel que l'acide bétulinique (tableau XII) qui possède un groupe 11-ceto et une fonction hydrophile sur le cycle A du pentacycle très important pour l'inhibition de la synthèse des leucotriènes via l'inhibition des lipoxygénases (**Facino et al., 1995**). De plus, les triterpènes sont reconnus comme des inhibiteurs du NO dans les macrophages (**An et al., 2011**) activés. L'acide bétulinique identifié par CLHP/SM dans cette fraction est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires *in vivo* (**Oliveira Costa et al., 2014**). Le lupéole (CI₅₀ de 28,74 ± 0,05 µg/mL), un autre triterpène isolé dans la fraction PAH, a significativement (p < 0,05) inhibé la production du NO dans des cellules RAW 264.7 stimulées par des LPS dans notre étude. Parlant de l'inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase, la fraction à l'hexane de PA est plus active que l'extrait des feuilles de *Terminalia chebula* étudié par **Eshwarappa et al. (2016)** car présentant une CI₅₀ plus faible que celle obtenue par cet auteur.

En considérant les valeurs des CE₅₀/CI₅₀ présentées dans les tableaux VII, VIII et IX, l'absorbance (tableau VI), le pourcentage d'inhibition des activités de l'élastase (figures 30) et de la tyrosinase (figures 32), les fractions hexaniques et méthanoliques respectives de *P. aurantiacum* et *H. madagascariensis* possèdent à la fois des potentiels antioxydants, anti-inflammatoire et sont inhibiteurs de l'élastase et de tyrosinase. Elles possèdent donc un potentiel anti-vieillessement cutané. Ces fractions ont été sélectionnées pour l'étude de la protection des cellules de peau contre le vieillissement induit par les rayons UVB.

Les rayons UVB sont l'une des composantes les plus dangereuses de la lumière du soleil. En raison de leur forte énergie, ils sont capables de traverser l'épiderme et d'atteindre le derme supérieur où ils interagissent avec les cellules, entraînant des dommages de l'ADN et une augmentation du stress oxydatif. L'augmentation de l'intensité du rayonnement UVB sur la terre due à la destruction de la couche d'ozone par les polluants atmosphériques pose un problème environnemental majeur car ceci augmente le risque de vieillissement cutané et de cancer de la peau (**Cavinato et al., 2017; Mohamed et al., 2014**). Les modèles de cellules irradiées aux UVB sont souvent utilisés pour évaluer les propriétés antiviellissement des plantes médicinales (**Imokawa et al., 2015**).

Dans notre étude, les fibroblastes et les mélanomes obtenus des peaux de souris et irradiés par les rayons UVB ont été utilisés comme modèle cellulaire. Ces cellules sont

communément utilisées car présentent l'avantage de se multiplier facilement *in vitro* et de reproduire la quasi-totalité de la pathophysiologie du photovieillissement (**Pillaiyar et al., 2017; Goldberg B, 1977**). Le stress oxydatif intracellulaire a été généré en exposant les cellules en culture aux rayons UV-B (**Bravo et al., 2017**). Le potentiel antioxydant des fractions a été évalué par leur capacité à protéger les cellules du stress oxydatif en utilisant le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H₂DCFDA). Le H₂DCFDA est couramment utilisé pour évaluer le stress oxydatif intracellulaire, car lors du stress, il devient fluorescent, ce qui permet de visualiser les cellules (**Sonani et al., 2017**). Il a été observé que les cellules traitées à l'UVB présentaient une fluorescence importante, alors que les cellules prétraitées avec des fractions ou la vitamine C présentaient divers niveaux de diminution de la fluorescence (figures 44 et 45). Ces résultats prouvent que les fractions ont été capables de protéger efficacement les cellules de la peau de souris contre le stress oxydatif induit par les UVB.

La protection des cellules de la peau contre le stress oxydatif nécessite la coopération de différents mécanismes. L'un d'eux protège les composants cellulaires contre les dommages oxydatifs par la biosynthèse de protéines antioxydantes, laquelle dépend de l'activité du facteur de transcription nucléaire érythroïde 2 (Nrf-2) (**Gęgotek et Skrzydlewska, 2015**). L'augmentation de l'activité de Nrf-2 augmente la résistance des cellules au stress oxydatif provoquée par les rayons UV et les produits chimiques et, par conséquent, pourrait réduire le risque de cancer. Le facteur Nrf-2, en particulier dans les kératinocytes et les mélanocytes, protège ces cellules contre la mutation au cours du processus de kératinisation et de mélanogenèse (**Gęgotek et Skrzydlewska, 2015**). Cependant, dans le fibroblaste, il joue un rôle important dans la protection de ces cellules contre la différenciation et la fibrose. De plus, la participation du facteur Nrf-2 dans la cicatrisation des plaies et dans l'arrêt du processus de l'inflammation est également essentielle au maintien de l'intégrité de la peau (**Gęgotek et Skrzydlewska, 2015; Schäfer et al., 2014**). Le contrôle d'un large éventail d'antioxydants et de molécules anti-apoptotiques fait que le Nrf-2 est reconnu comme un facteur important de la réponse cellulaire au stress oxydatif, en particulier dans les cellules qui forment les couches extérieures de la peau. Le facteur Nrf-2 est donc devenu une cible moléculaire prometteuse en pharmacologie dans la prévention des pathologies humaines résultant de l'exposition à des toxiques de l'environnement, y compris les dommages causés par les rayons UV et la cancérogenèse (**Rojo de la Vega et al., 2017**).

Il existe un certain nombre de médicaments (par exemple, le kétoconazole) utilisés dans la pharmacothérapie des maladies de la peau sur la base de l'activation de Nrf-2, mais ils peuvent également induire un stress oxydatif (**Schäfer et al., 2014**). Par conséquent, il est important de rechercher des composés qui provoquent une activation sélective de Nrf-2, en particulier des substances naturelles (**Gęgotek et Skrzydlewska, 2015; Rojo de la Vega et al., 2017; Schäfer et al., 2014**). Les résultats de notre étude ont montré que les fractions à l'hexane de HM et de PA ont provoqué l'augmentation des niveaux d'expression d'ARNm du Nrf-2 dans les fibroblastes et les mélanomes de peaux de souris (figure 46A, E et figure 47A, E) tout en réduisant le niveau du stress oxydatif dans ces cellules (figure 44 et 45), suggérant ainsi que ces fractions possèdent une puissante capacité antioxydante et peuvent intervenir dans la protection des cellules de la peau contre les UVB.

L'appauvrissement en protéines antioxydantes intracellulaires est l'une des principales causes des lésions et de mortalité cellulaires, alors que sa prévention par un traitement exogène constitue une stratégie efficace dans diverses cellules somatiques, notamment les fibroblastes et le mélanome (**Jadeja et al., 2015**). Parmi ces protéines antioxydantes l'hème oxygénase-1 (HO-1) joue un rôle important dans la cytoprotection contre les dommages oxydatifs dans la peau (**Ryu et al., 2019**). HO-1 régule l'étape limitant du catabolisme de l'hème, entraînant la production du monoxyde de carbone, du fer ferreux et de la biliverdine. La biliverdine est encore dégradée en bilirubine par l'action de la biliverdine réductase. Les espèces oxygénées réactives (EOR) intracellulaires sont neutralisées par les produits finaux du catabolisme de l'hème, indiquant les propriétés antioxydantes de ces produits (**Ryu et al., 2019**). Il est à noter que l'activation du facteurs Nrf-2 est crucial pour la régulation à la hausse de HO-1 et aussi ces gènes ont été identifiés comme des acteurs clés qui protègent la déplétion du glutathion intracellulaire par une réponse rapide à la suite d'une lésion cellulaire induite expérimentalement (**Jadeja et al., 2015; Zhao et al., 2018**). Les résultats révèlent que la fraction hexanique de PA et HM ramène à la normale les niveaux d'expressions d'ARNm de HO-1 dans les mélanomes et les fibroblastes de peaux de souris (figure 46 Fet 47 B).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la fraction hexanique de PA protège les cellules du stress oxydatif induit par les rayons UVB en réduisant le stress oxydatif intracellulaire et en augmentant le niveau d'ARNm du facteur Nrf-2, ce qui se traduit par une régulation positive des gènes de HO-1 dans les cellules NIH/3T3.

Le collagène de type I, l'un des principaux éléments constitutifs de la peau, est le composant principal du tissu conjonctif, des cheveux et des ongles. Il est responsable de l'élasticité, de la résistance de la peau et du maintien de sa souplesse. Le métabolisme du collagène est important pour les processus biologiques cutanés (**Song et al., 2017**). Parmi les collagénases, la MMP-1 est principalement responsable de la dégradation du collagène de type I et est également responsable de la destruction de la matrice extracellulaire. Ce qui entraîne le vieillissement de la peau, l'apparition des rides et des tumeurs (**Mohamed et al., 2014; Song et al., 2017**). Il est bien connu que la sécrétion accrue de MMP-1 ainsi que la suppression du procollagène de type I par les radiations UV sont les caractéristiques les plus distinguées du photovieillesent (**Su et al., 2009**). Ainsi, les agents ayant des propriétés antioxydantes, qui réduisent la production de MMP-1 et accélèrent la synthèse du collagène type I sont considérés comme des potentiels candidats dans la prévention de photovieillesent de la peau (**Ryu et al., 2019; Shin et al., 2018**).

Dans cette étude, nous avons examiné l'association de MMP-1 et la production de procollagène de type I dans le photovieillesent cutané induit par les UVB. Les résultats ont montré que l'exposition des fibroblastes aux rayons UVB entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm du procollagène de type I (COL1A1) et une augmentation de l'ARNm du MMP-1. Le prétraitement des cellules avec la fraction HMH et PAM a réduit le niveau d'ARNm de la MMP-1 tout en augmentant celui du COL1A1 (figure 42 A, E et 42 E, F). Les fractions ont également atténué les changements morphologiques causés par les radiations UVB (figure 41). Ces données indiquent que les fractions HMH et PAM ont protégé les cellules de la peau de souris des dommages induits par les UVB en augmentant le niveau d'expression de l'ARNm du procollagène de type I tout en empêchant sa dégradation par les MMP-1. Ils ont aussi protégé les cellules cutanées du changement morphologique induit par les UVB. Cet effet photoprotecteur peut s'expliquer par la présence dans ces fractions de composés phénoliques hydroxylés (tableau XII) reconnus comme inhibiteurs des MMPs et activateurs de la synthèse du collagène. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Deng et al. (2018)** qui ont démontré que le Crocine, un constituant bioactif de *Crocus sativus*, favorisait l'expression du COL1A1 via l'inhibition des MMPs.

La mélanine, principal pigment de la couleur de la peau et des cheveux chez les mammifères, joue un rôle bénéfique dans la photoprotection de la peau humaine contre les rayons ultraviolets nocifs et, joue aussi un rôle essentiel dans l'évolution du camouflage et du

mimétisme animal (**D’Mello et al., 2016**). La mélanogénèse est par définition la production des mélanines par des cellules appelées mélanocytes. La synthèse de mélanine est contrôlée par des enzymes de mélanogénèse, notamment la tyrosinase, TRP-1 et TRP-2, qui sont régulées par le facteur de transcription associé à la microphthalmie (MITF) (**Kim et al., 2018; Ma and Kim, 2014**). Les deux étapes initiales du processus de mélanogénèse, l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) et l'hydroxylation de DOPA en DOPAquinone sont catalysées par la tyrosinase. La TRP-2 catalyse le réarrangement de l'acide DOPochrome en acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA) et l'oxydation de DHICA en acide indole-5,6-quinone-2-carboxylique est catalysée par la TRP-1 (**Baradaran Rahimi et al., 2017**). Les enzymes de la mélanogénèse notamment la TYR et la TRP-1 sont sensibles à plusieurs stimuli tels que : l'inflammation chronique, les rayons ultraviolets et une libération anormale d'hormone stimulant les α -mélanocytes (α -MSH) (**Baradaran Rahimi et al., 2017**). Il s'en suit une biosynthèse excessive de mélanine qui provoque plusieurs affections cutanées, notamment le mélanome, le mélasma, les lentigines, les taches de rousseur et les taches de vieillesse. La tyrosinase contrôle deux étapes clés de la synthèse de la mélanine, par conséquent sa production est corrélée au niveau d'expression et de l'activité catalytique de la tyrosinase (**Baradaran Rahimi et al., 2017; Najaran et al., 2016**).

L'identification d'un inhibiteur de la tyrosinase est importante dans le développement de produits cosmétiques et de médicaments traitant l'hyperpigmentation de la peau. Certains inhibiteurs de la tyrosinase, tels que l'acide kojique, l'hydroquinone et le stilbène, sont utilisés dans les industries cosmétiques en raison de leurs effets anti-mélanogénèse via des mécanismes d'inhibitions multiples parmi lesquels: l'inhibition de la transcription de l'ARNm de la tyrosinase; inhibition de l'activité catalytique de la tyrosinase; l'accélération de la dégradation de la tyrosinase et la régulation indirecte de l'activité de la tyrosinase par chélation des ions Cu^{2+} (**Baradaran Rahimi et al., 2017**). Cependant, ces agents synthétiques provoquent souvent des effets secondaires indésirables sur la peau, tels que la dermatite de contact et l'érythème. Par conséquent, de nouveaux agents de blanchiment de la peau alternatifs, comprenant des composés naturels ayant une efficacité plus puissante mais moins d'effets néfastes, sont nécessaires à des fins cosmétiques et médicales (**Baradaran Rahimi et al., 2017; Choi et Shin, 2016**).

Dans cette étude, nous avons mesuré l'effet hypopigmentant dans les cellules de mélanome B16F10 des fractions sélectionnées de PA et HM démontraient un. Nous avons constaté que les fractions HMH réduisent les niveaux d'ARNm de tyrosinase et d'ARNm *de la tyrosinase related proteine-1* avec ou sans exposition aux UV-B (figure 40 et 43). En outre, les fractions méthanolique de HM ramènent le niveau d'ARNm de tyrosinase à la normal et non celui de la *tyrosinase related proteine-1*. La fraction hexanique et méthanolique de PA réduisaient le niveau d'ARNm de tyrosinase et la synthèse de la mélanine dans les mélanomes (figure 43 et 49). Ces résultats suggèrent que les fractions hexanique et méthanolique de PA exercent un effet anti-mélanogénèse via l'inhibition de l'expression du gène de la mélanogénèse (TYR). Par conséquent, ces fractions représentent une source potentielle de composés hypopigmentant. Cette activité pourrait s'expliquer par la présence des groupements hydroxyles dans les structures des composés isolés de la fraction PAH et identifiés dans la fraction PAM (tableau XII). Il a été démontré que le nombre de groupement OH et leur position jouaient un rôle important dans l'inhibition de la tyrosinase et influencerait aussi l'accumulation de la mélanine dans les cellules de mélanomes B16F10 (Maeda *et al.*, 2007; Ullah *et al.*, 2007). Les résultats obtenus dans notre étude se rapprochent de ceux de Lee *et al.*, 2017) qui ont démontré que les flavonoïdes de *Limonium tetragonum* réduisaient la synthèse de la mélanine dans les cellules B16F10 via l'inhibition de la tyrosinase.

Après étude de l'effet protecteur des fractions sélectionnées contre les dommages induits par les rayons UVB sur les cellules de la peau de souris, le troisième objectif de notre travail consistait à déterminer le profil phytochimique des fractions intéressantes et à évaluer l'activité anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et anti-élastase de quelques composés isolés. Afin de mieux comprendre à travers quels composés les fractions agissent. Les plantes médicinales contiennent plusieurs constituants phytochimiques tels que les polyphénols, les alcaloïdes, les tanins, les saponines, les caroténoïdes, et les terpénoïdes qui possèdent des propriétés antiviellissement cutané (Cavinato *et al.*, 2017). Ces constituants peuvent agir en réduisant le stress oxydatif ou en inhibant diverses enzymes impliqués dans le mécanisme du vieillissement cutané telles que les métalloprotéinases, l'élastase, l'hyaluronidase et la tyrosinase (Garg *et al.*, 2017). L'isolement des composés de la fraction PAH a permis l'identification de trois composés purs connus comme 3-géranyloxyémodinanthrone, 3-géranyloxyémidine et lupéole. A l'exception des études effectuées sur le lupéole (anti-inflammatoire, antioxydant et anticancéreux) et sur l'acide bétulinique (anti-inflammatoire et

anti-tyrosinase) (Beserra *et al.*, 2019; Gallo and Sarachine, 2009; Kashif *et al.*, 2017), d'autres composés n'ont pas encore été étudiés pour leurs propriétés anti-âge cutané. Les composés ont été analysés par docking moléculaire qui est une méthode de choix et rapide dans le criblage des composés pour analyse biologique (Rawal *et al.*, 2019). Les résultats ont montré que le lupéole a une grande affinité avec l'élastase car possède la plus faible énergie de liaison -12,83 Kcal/mol (tableau XII). Il est par conséquent le meilleur inhibiteur de l'élastase et forme ainsi un complexe stable avec cet enzyme. Ceci pourrait s'expliquer par la présence dans sa structure du groupement hydroxyle à l'extrémité de la chaîne latérale, et donc peut former, contrairement à la 3-géranyloxyémodinanthrone et la 3-géranyloxyémodyne, des liaisons hydrogène plus fortes, avec les acides aminés du site actif de l'élastase (figure. 54). Cette activité a été confirmée *in vitro*: le lupéole (88,09%) a présenté le pourcentage d'inhibition de l'élastase le plus élevé à 10µg/mL (figure 58). La 3-géranyloxyémodyne a formé le complexe le plus stable avec la lipoxigénase (figure 60) par contre cette activité n'a pas été observée *in vitro*, l'inhibition de la lipoxigénase a plutôt été observée avec la 3-géranyloxyémodinanthrone (tableau XIV). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le *docking* est une approche basée sur les simulations bio-informatiques, les études expérimentales devraient être conduites pour la validation des résultats du *docking* moléculaire (Rawal *et al.*, 2019).

Au terme de cette discussion, nous observons que la fraction hexanique de *H. madagascariensis* et les fractions hexanique et méthanoliques de *P. aurantiacum* exercent leur effet anti-âge cutané via multiples mécanismes: elles limitent l'inflammation à travers l'inhibition de la 15-lipoxigénase et l'inhibition de la production du NO dans les macrophages activés, elles réduisent le stress oxydatif intracellulaire via l'activation du facteur de transcription Nrf-2 qui se traduit par l'activation de l'enzyme hème oxygénase-1, elles augmentent les niveaux d'expression des gènes COL1A1 tout en réduisant ceux du gène de MMP-1 et, réduisent la mélanine synthétisée dans les mélanomes via l'inhibition de l'expression des gènes TYR et TRP-1. Au vu des multiples activités observées simultanément par ces fractions actives et les limites dues à l'utilisation des produits cosmétiques de nos jours, ces fractions représentent des sources prometteuses des composés pour les soins de la peau. L'étude des mécanismes d'action des composés contenus dans ces fractions devrait être analysée.

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

1. Conclusion générale

Au terme de ce travail dont l'objectif général visait à étudier l'effet bioguidé de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum* sur quelques aspects biochimiques du vieillissement cutané : le stress oxydatif, l'inflammation, la surproduction de la mélanine, et la dégradation du collagène, il en ressort ce qui suit :

- sur les quatorze fractions obtenues, seules quatre fractions (les fractions hexanique et méthanolique de *H. madagascariensis* et de *P. aurantiacum*) ont présenté des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-tyrosinase et anti-élastase. Ces fractions ont été retenues comme possédant un potentiel antiviellissement cutané ;
- les quatre fractions sélectionnées et testées, sur les modèles cellulaires de photovieillissement induit par les rayons UVB ont montré ce qui suit: les fractions hexanique et méthanolique de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* réduisent le stress oxydatif intracellulaire dans les mélanomes B16F10 et les fibroblastes NIH/3T3 de peau de souris cependant, la fraction hexanique de *P. aurantiacum* en plus de la réduction du stress oxydatif restaure le niveau d'ARNm des gènes qui contrôlent le stress (Nrf-2 et HO-1). Cette propriété est associée à la réduction de la biosynthèse de la mélanine dans les mélanomes B16F10 par réduction des niveaux d'ARNm de la tyrosinase (TYR) et la tyrosinase related protein-1 (TRP-1); concomitamment, les fractions hexanique de *H. madagascariensis* et méthanolique de *P. aurantiacum* protègent la dégradation de la matrice extracellulaire en augmentant le niveau de synthèse de l'ARNm du collagène de type I (COL1A1) et en diminuant celui de l'ARNm de la matrice metalloproteinase-1 (MMP-1) dans les fibroblastes NIH/3T3;
- l'analyse par CL-MS des fractions actives a montré que : La fraction hexanique de *H. madagascariensis* et la fraction méthanolique de *P. aurantiacum* sont des mélanges de plusieurs composés dont quelques uns ont été identifiés. La 3-géranyloxyémodyline, la 3-géranyloxyémodylanthrone et le lupéole ont été isolés de la fraction hexanique de *P. aurantiacum*. Le lupéole et la 3-géranyloxyémodylanthrone ont montré une inhibition des activités de l'élastase, de la tyrosinase et de l'inflammation par amarrage moléculaire et par les tests *in vitro*. Ce qui montre leurs participations aux activités observées.

Au regard des activités exercées par les fractions, on observe que la fraction hexanique de *H. madagascariensis*, les fractions hexanique et méthanolique de *P. aurantiacum* présentent à la fois les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-mélanogénèse et protègent le collagène et l'élastine contre les effets nocifs de rayons UVB. Ces résultats justifient l'utilisation traditionnelle de ces plantes par les populations de Foumban (region de l'Ouest) et Nkol'Anga (region du Centre) dans les soins de la peau et représentent ainsi un argument solide pour la valorisation de *H. madagascariensis* et *P. aurantiacum* comme sources potentielles de composés actifs pouvant remplacer l'utilisation de l'hydroquinone et des corticoïdes dans la prévention du processus d'altérations cutanées causées par les rayons UVB. Cependant, d'autres études complémentaires sont nécessaires en vue de renforcer les résultats obtenus.

2. Perspectives

Nous envisageons dans un futur proche de :

- déterminer l'effet des fractions actives sur la biosynthèse du collagène et mélanine au niveau protéique ou sur les gènes de régulation ;
- rechercher les supports des activités de la fraction la plus intéressante ;
- déterminer le type d'inhibition des composés isolés sur l'activité de l'élastase et la lipoxygénase.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Amaro-Ortiz, A., Yan, B., and D’Orazio, J. (2014).** Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules* 19, 6202–6219.
2. **An, H.-J., Kim, I.-T., Park, H.-J., Kim, H.-M., Choi, J.-H., and Lee, K.-T. (2011).** Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor- κ b pathway in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology* 11, 504–510.
3. **Arung, E., T., Matsubara, E., Kusuma, I. W., Sukaton, E., Shimizu, K., and Kondo, R. (2011).** Inhibitory components from the buds of clove (*Syzygium aromaticum*) on melanin formation in B16 melanoma cells. *Fitoterapia* 82, 198–202.
4. **Assaf, H., Adly, M. A., and Hussein, M. R. (2015).** “Aging and Intrinsic Aging: Pathogenesis and Manifestations,” in *Textbook of Aging Skin*, eds. M. A. Farage, K. W. Miller, and H. I. Maibach (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 1–12.
5. **Awala, S. I., and Oyetayo, V. O. (2016).** Assessment of Free Radical Scavenging Potentials of Extracts of *Trametes lactinea* Collected from Akure. *Research Journal of Phytochemistry* 10, 10–20.
6. **Babizhayev, M. A., Deyev, A. I., Savel’Yeva, E. L., Lankin, V. Z., and Yegorov, Y. E. (2012).** Skin beautification with oral non-hydrolyzed versions of carnosine and carnitine: Effective therapeutic management and cosmetic skincare solutions against oxidative glycation and free-radical production as a causal mechanism of diabetic complications and skin aging. *Journal of Dermatological Treatment* 23, 345–384.
7. **Baradaran R. V., Askari, V. R., Emami, S. A., and Tayarani-Najaran, Z. (2017).** Anti-melanogenic activity of *Viola odorata* different extracts on B16F10 murine melanoma cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 20.
8. **Belbayane, S. (2015).** Cosmétologie et vieillissement cutané. *Thèse de Doctorat de l’Université Mohammed V de Rabat*, 202.

9. **Ben-Yehuda Greenwald, M., Ben-Sasson, S., Bianco-Peled, H., and Kohen, R. (2016).** Skin Redox Balance Maintenance: The Need for an Nrf2-Activator Delivery System. *Cosmetics* 3, 1.
10. **Beserra, F. P., Vieira, A. J., Gushiken, L. F. S., de Souza, E. O., Hussni, M. F., Hussni, C. A., et al. (2019).** Lupeol, a Dietary Triterpene, Enhances Wound Healing in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats with Modulatory Effects on Inflammation, Oxidative Stress, and Angiogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, 1–20.
11. **Blažeković, B., Vladimir-Knežević, S., Brantner, A., and Štefan, M. (2010).** Evaluation of Antioxidant Potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. “Budrovka”: A Comparative Study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules* 15, 5971–5987.
12. **Blume-Peytavi, U., Kottner, J., Sterry, W., Hodin, M. W., Griffiths T. W., Watson, E. B. R. et al. (2015).** Age-Associated Skin Conditions and Diseases: current Perspectives and Future Options. *The Gerontologist*. 56, 230-242
13. **Bosch, R., Philips, N., Suárez-Pérez, J., Juarranz, A., Devmurari, A., Chalensouk-Khaosaat, J., et al. (2015).** Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants* 4, 248–268.
14. **Bravo, K., Duque, L., Ferreres, F., Moreno, D. A., and Osorio, E. (2017).** Passiflora tarminiana fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 168, 78–88.
15. **Buckingham, E. M., and Klingelutz, A. J. (2011).** The role of telomeres in the ageing of human skin: Telomeres and skin ageing. *Experimental Dermatology* 20, 297–302.
16. **Cals-Grierson, M.-M., and Ormerod, A. D. (2004).** Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide* 10, 179–193.

17. **Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C. V. C., Stuppner, H., and Jansen-Dürr, P. (2017).** Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology* 18, 499–516.
18. **Chaiprasongsuk, A., Lohakul, J., Soontrapa, K., Sampattavanich, S., Akarasereenont, P., and Panich, U. (2017).** Activation of Nrf2 Reduces UVA-Mediated MMP-1 Upregulation via MAPK/AP-1 Signaling Cascades: The Photoprotective Effects of Sulforaphane and Hispidulin. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 360, 388–398.
19. **Chaurasiya, S., Kaur, P., Nayak, S. K., and Khatik, G. L. (2016).** Virtual screening for identification of novel potent EGFR inhibitors through Autodock Vina molecular modeling software. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 353-360.
20. **Cho, S., Won, C.-H., Lee, D. H., Lee, M.-J., Lee, S., So, S.-H., et al. (2009).** Red Ginseng Root Extract Mixed with *Torilus Fructus* and *Corni Fructus* Improves Facial Wrinkles and Increases Type I Procollagen Synthesis in Human Skin: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of Medicinal Food* 12, 1252–1259.
21. **Choi, M.-H., and Shin, H.-J. (2016).** Anti-Melanogenesis Effect of Quercetin. *Cosmetics* 3, 1-16.
22. **Deng, M., Li, D., Zhang, Y., Zhou, G., Liu, W., Cao, Y., et al. (2018).** Protective effect of crocin on ultraviolet B-induced dermal fibroblast photoaging. *Molecular Medicine Reports*.1439-1446.
23. **D’Mello, S., Finlay, G., Baguley, B., and Askarian-Amiri, M. (2016).** Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1-18
24. **Dong, Y., Tang, D., Zhang, N., Li, Y., Zhang, C., Li, L., et al. (2013).** Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum*. *Chemistry Central Journal* 7, 124.
25. **D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., and Scott, T. (2013).** UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 12222–12248.

26. **Drakaki, E., Dessinioti, C., and Antoniou, C. V. (2014).** Air pollution and the skin. *Frontiers in Environmental Science* 2.
27. **Ebrahimzadeh, M. A., Enayatifard, R., Khalili, M., Ghaffarloo, M., Saeedi, M., and Charati, Y. J. (2014).** Correlation between Sun Protection Factor and Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of some Medicinal Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 13, 1041–1047.
28. **Elma, D. (2016).** LE photovieillissement: Aspects cliniques mecanismes biologiques mis en jeu et transmission du message scientifique a travers la construction d un outil pedagogique le poster scientifique. *Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard-Lyon I*, 97.
29. **Epifano, F., Fiorito, S., and Genovese, S. (2013).** Phytochemistry and pharmacognosy of the genus *Psorospermum*. *Phytochemistry Reviews* 12, 673–684.
30. **Eshwarappa, R. S. B., Ramachandra, Y. L., Subaramaihha, S. R., Subbaiah, S. G. P., Austin, R. S., and Dhananjaya, B. L. (2016).** Anti-Lipoxygenase Activity of Leaf Gall Extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Research* 8, 78–82.
31. **Facino, R. M., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., and Saibene, L. (1995).** Anti-Elastase and Anti-Hyaluronidase Activities of Saponins and Sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: Factors Contributing to their Efficacy in the Treatment of Venous Insufficiency. *Archiv der Pharmazie* 328, 720–724.
32. **Farage, M. A., Miller, K. W., and Maibach, H. I. eds. (2010).** *Textbook of aging skin*. Berlin: Springer.
33. **Fisher, G. J., Wang, Z., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1997).** Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. *New England Journal of Medicine* 337, 1419–1429.
34. **Freitas-Rodríguez, S., Folgueras, A. R., and López-Otín, C. (2017).** The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 2015–2025.

35. **Fu, L., Xu, B.-T., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xu, X.-R., Xia, E.-Q., et al. (2011).** Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Herbal and Tea Infusions. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 2112–2124.
36. **Gallé J. B. (2015).** Pharmacochimie d'anthranoides issus du genre *Psorospernum* (Hypericaceae): isolement, activités antiparasitaires et synthèse d'analogues structuraux. Thèse de Doctorat de l'université de Strasbourg. 358p.
37. **Gallo, M. B. C., and Sarachine, M. J. (2009).** Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Green Pharmacy* 21, 1-21.
38. **Galván-Peña, and O'Neill (2014).** Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Frontiers in Immunology*, 5.
39. **Garg, C., Khurana, P., and Garg, M. (2017).** Molecular mechanisms of skin photoaging and plant inhibitors. *International Journal of Green Pharmacy*, 16.
40. **Gašperlin, M., and Gosenca, M. (2011).** Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. *Expert Opinion on Drug Delivery* 8, 905–919.
41. **Gęgotek, A., Bielawska, K., Biernacki, M., Dobrzyńska, I., and Skrzydlewska, E. (2017).** Time-dependent effect of rutin on skin fibroblasts membrane disruption following UV radiation. *Redox Biology* 12, 733–744.
42. **Gęgotek, A., and Skrzydlewska, E. (2015).** The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Archives of Dermatological Research* 307, 385–396.
43. **Goldberg, B. (1977).** Collagen synthesis as a marker for cell type in mouse 3T3 lines. *Cell* 11, 109-172.
44. **Guerrero-Perilla, C., Bernal, F. A., and Coy-Barrera, E. D. (2015).** Molecular docking study of naturally occurring compounds as inhibitors of N-myristoyl transferase towards antifungal agents discovery. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 44, 162–178.
45. **Han, H.-S., Shin, J.-S., Myung, D.-B., Ahn, H., Lee, S., Kim, H., et al. (2019).** Hydrangea serrata (Thunb.) Ser. Extract Attenuate UVB-Induced Photoaging through

- MAPK/AP-1 Inactivation in Human Skin Fibroblasts and Hairless Mice. *Nutrients* 11, 533.
46. **Harborne, J. B. (1980).** *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London ; New York: Chapman and Hall.
47. **Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572-584.
48. **Hirobe, T. (2014).** Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sinica* 32, 200–204.
49. **Holick, M. F. (2016).** Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. *Anticancer Research*. 36, 1345–1356.
50. **Hong, Y., Song, B., Chen, H.-D., and Gao, X.-H. (2015).** Melanocytes and Skin Immunity. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 17, 37–39.
51. **Horng, C.-T., Wu, H.-C., Chiang, N.-N., Lee, C.-F., Huang, Y.-S., Wang, H.-Y., et al. (2017).** Inhibitory effect of burdock leaves on elastase and tyrosinase activity. *Experimental and Therapeutic Medicine* 14, 3247–3252.
52. **Hseu, Y.-C., Chou, C.-W., Senthil Kumar, K. J., Fu, K.-T., Wang, H.-M., Hsu, L.-S., et al. (2012).** Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1245–1255.
53. **Hsu, M.-F., and Chiang, B.-H. (2009).** Stimulating effects of *Bacillus subtilis* natto-fermented Radix astragali on hyaluronic acid production in human skin cells. *Journal of Ethnopharmacology* 125, 474–481.
54. **Hulya Celik Onar (2012).** Elastase, tyrosinase and lipoxygenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. *Journal of Medicinal Plants Research* 6.

55. **Ichihashi, M., Yagi, M., Nomoto, K., and Yonei, Y. (2011).** Glycation Stress and Photo-Aging in Skin. *anti-aging medicine* 8, 23–29.
56. **Imokawa, G., Nakajima, H., and Ishida, K. (2015).** Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging II: Over-Expression of Neprilysin Plays an Essential Role. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 7776–7795.
57. **Iwalewa, E. O., Omisore, N. O., Adewunmi, C. O., Gbolade, A. A., Ademowo, O. G., Nneji, C., et al. (2008).** Anti-protozoan activities of *Harungana madagascariensis* stem bark extract on trichomonads and malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 507–511.
58. **Jadeja, R. N., Urrunaga, N. H., Dash, S., Khurana, S., and Saxena, N. K. (2015).** Withaferin-A Reduces Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice. *Biochemical Pharmacology* 97, 122–132.
59. **Jadoon, S., Karim, S., Asad, M. H. H. B., Akram, M. R., Kalsoom Khan, A., Malik, A., et al. (2015).** Anti-Aging Potential of Phytoextract Loaded-Pharmaceutical Creams for Human Skin Cell Longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 1–17.
60. **Jameson, J. B., Kantz, A., Schultz, L., Kalyanaraman, C., Jacobson, M. P., Maloney, D. J., et al. (2014).** A High Throughput Screen Identifies Potent and Selective Inhibitors to Human Epithelial 15-Lipoxygenase-2. *PLoS One* 9.
61. **Kashif, M., Akhtar, N., and Mustafa, R. (2017).** An overview of dermatological and cosmeceutical benefits of *Diospyros kaki* and its phytoconstituents. *Brasilian Journal of Pharmacognosy* 27, 650–662.
62. **Kim, C.-S., Park, S., and Kim, J. (2017).** The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 21, 55–61.
63. **Kim, E., Kim, D., Yoo, S., Hong, Y. H., Han, S. Y., Jeong, S., et al. (2018).** The skin protective effects of compound K, a metabolite of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng*. *Journal of Ginseng Research* 42, 218–224.

64. **Kim, J., Kang, Y.-G., Lee, J., Choi, D., Cho, Y., Shin, J.-M., et al. (2015).** The natural phytochemical dehydroabietic acid is an anti-aging reagent that mediates the direct activation of SIRT1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 412, 216–225.
65. **Kim, T., Kim, H. J., Cho, S. K., Kang, W. Y., Baek, H., Jeon, H. Y., et al. (2011).** *Nelumbo nucifera* extracts as whitening and anti-wrinkle cosmetic agent. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28, 424–427.
66. **Ko, R. K., Kim, G.-O., Hyun, C.-G., Jung, D. S., and Lee, N. H. (2011).** Compounds with Tyrosinase Inhibition, Elastase Inhibition and DPPH Radical Scavenging Activities from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. *Phytotherapy Research* 25, 1451–1456.
67. **Koo, J.-H., Kim, H. T., Yoon, H.-Y., Kwon, K.-B., Choi, I.-W., Jung, S. H., et al. (2008).** Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Experimental and Molecular Medicine* 40, 313.
68. **Kourouma, S., Gbery, I. P., Ecra, E. J., Sangaré, A., Kaloga, M., Kouassi, I. Y., et al. (2016).** Dépigmentation cutanée cosmétique des femmes noires: résultats d'une enquête CAP à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Pan African Medical Journal* 24.
69. **Kumar, P. S., Sucheta, S., Deepa, V. S., Selvamani, P., and Latha, S. (2008).** Antioxidant activity in some selected Indian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 7, 1826–1828.
70. **Kumar, R., and Hemalatha, S. (2011).** In-vitro antioxidant activity of alcoholic leaf extract and sub- fractions of *Alangium lamarckii* Thwaites. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3(1): 259-267.
71. **Kuo, Y.-H., Wu, P.-Y., Chen, C.-W., Lin, P., Wen, K.-C., Lin, C.-Y., et al. (2017).** N-(4-bromophenethyl) Caffeamide Protects Skin from UVB-Induced Inflammation Through MAPK/IL-6/NF-κB-Dependent Signaling in Human Skin Fibroblasts and Hairless Mouse Skin. *Molecules* 22, 1639.
72. **Kwon, K.-R., Alam, M. B., Park, J.-H., Kim, T.-H., and Lee, S.-H. (2019).** Attenuation of UVB-Induced Photo-Aging by Polyphenolic-Rich *Spatholobus*

Suberectus Stem Extract Via Modulation of MAPK/AP-1/MMPs Signaling in Human Keratinocytes. *Nutrients* 11, 1341.

73. **Laskowski, R. A., and Swindells, M. B. (2011).** LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51, 2778–2786.
74. **Lee, C. J., Chen, L. G., Chang, T. L., Ke, W. M., Lo, Y. F., and Wang, C. C. (2011).** The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chemistry* 124, 833–841.
75. **Lee, H. J., Kim, J. S., Song, M. S., Seo, H. S., Moon, C., Kim, J. C., et al. (2009).** Photoprotective effect of red ginseng against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Phytotherapy Research* 23, 399–403.
76. **Lee, K. K., and Choi, J.-D. (1999).** The Effects of *Areca Catechu* L Extract on Anti-Aging. *International Journal of Cosmetic Science* 21, 285–295.
77. **Lee, S.-G., Karadeniz, F., Seo, Y., and Kong, C.-S. (2017).** Anti-Melanogenic Effects of Flavonoid Glycosides from *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock via Inhibition of Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Molecules* 22, 1480.
78. **Lee, Y. H., Seo, E. K., and Lee, S.-T. (2019).** Skullcapflavone II Inhibits Degradation of Type I Collagen by Suppressing MMP-1 Transcription in Human Skin Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2734.
79. **Lenta, B. N., Ngouela, S., Boyom, F. F., Tantangmo, F., Tchouya, G. R. F., Tsamo, E., et al. (2007).** Anti-plasmodial Activity of Some Constituents of the Root Bark of *Harungana madagascariensis* LAM. (Hypericaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55(4) 464-467.
80. **Lin, T.-K., Zhong, L., and Santiago, J. (2017).** Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 70.
81. **Lu, J., Guo, J.-H., Tu, X.-L., Zhang, C., Zhao, M., Zhang, Q.-W., et al. (2016).** Tiron Inhibits UVB-Induced AP-1 Binding Sites Transcriptional Activation on MMP-

1 and MMP-3 Promoters by MAPK Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts. *PLOS ONE* 11, e0159998.

82. **Ma, J., and Kim, A. (2014).** Anti-melanogenic activity of the novel herbal medicine, MA128, through inhibition of tyrosinase activity mediated by the p38 mitogen-activated protein kinases and protein kinase signaling pathway in B16F10 cells. *Pharmacognosy Magazine* 10, 463.
83. **Maeda, K., Naitou, T., Umishio, K., Fukuhara, T., and Motoyama, A. (2007).** A Novel Melanin Inhibitor: Hydroperoxy Traxastane-Type Triterpene from Flowers of *Arnica montana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30, 873–879.
84. **Manjia (2012).** Etude de l'effet de quelques plantes médicinales sur quelques facteurs du vieillissement cutané. Mémoire master. Université de Yaoundé I. 87p.
85. **Manosroi, A., Jantrawut, P., Akihisa, T., Manosroi, W., and Manosroi, J. (2010a).** *In vitro* anti-aging activities of *Terminalia chebula* gall extract. *Pharmaceutical Biology* 48, 469–481.
86. **Manosroi, A., Jantrawut, P., Akihisa, T., Manosroi, W., and Manosroi, J. (2010b).** *In vitro* anti-aging activities of *Terminalia chebula* gall extract. *Pharmaceutical Biology* 48, 469–481.
87. **Marrieb, E. N. (1999).** Anatomie et physiologie humaines, 4^e édition. De Boeck. Université. 765p.
88. **Mathen, C., Thergaonkar, R., Teredesai, M., Soman, G., and Peter, S. (2014).** Evaluation of anti-elastase and antioxidant activity in antiaging formulations containing *terminalia* extracts. *International Journal of Herbal Medicine* 2(2) 95–99.
89. **Mendes, D. A. G. B., Horinouchi, C. D. da S., Prudente, A. da S., Soley, B. da S., Assreuy, J., Otuki, M. F., et al. (2012).** In vivo participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. *European Journal of Pharmacology* 687, 1–8.
90. **Mohamed, M. A. A., Jung, M., Lee, S. M., Lee, T. H., and Kim, J. (2014).** Protective effect of *Disporum sessile* D.Don extract against UVB-induced photoaging

via suppressing MMP-1 expression and collagen degradation in human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 133, 73–79.

91. **Moon, J.-Y., Yim, E.-Y., Song, G., Lee, N. H., and Hyun, C.-G. (2010).** Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *EurAsian Journal of Biosciences*, 41–53.
92. **Morita, A. (2016).** “Tobacco Smoke and Skin Aging,” in *Textbook of Aging Skin*, eds. M. A. Farage, K. W. Miller, and H. I. Maibach (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 1–7.
93. **Moronkola, D. O., Yeboah, S., Majinda, R. T. and Yeboah, E. (2018).** Antioxydant properties of the methanol extract of leaf, stem, fruit and seed of Nigerian *Harungana madascariensis*, an hypericaceae (Gutiferae). *Europeans Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 5(9). 123-127.
94. **Moulari, B., Lboutounne, H., Chaumont, J.-P., Guillaume, Y., Millet, J., and Pellequer, Y. (2006).** Potentiation of the bactericidal activity of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*) leaf extract against oral bacteria using poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: *in vitro* study. *Acta Odontologica Scandinavica* 64, 153–158.
95. **Mukherjee, P. K., Maity, N., Nema, N. K., and Sarkar, B. K. (2011).** Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine* 19, 64–73.
96. **Na, E. J., and Ryu, J. Y. (2018).** Anti-inflammatory effects of prunin on UVB-irradiated human keratinocytes. *Biomedical Dermatology* 2.
97. **Negi, R., Pande, D., Kumar, A., Khanna, R. S., and Khanna, H. D. (2012).** Evaluation of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in the cord blood of preterm low birth weight neonates. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 25, 1338–1341.
98. **Ng, K. W., and Lau, W. M. (2015).** “Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration,” in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*, eds. N. Dragicevic and H. I. Maibach (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 3–11.

99. **Nichols, J. A., and Katiyar, S. K. (2010).** Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research* 302, 71–83.
100. **Nimenibo-Uadia, R., and Nwachukwu, K. (2017).** Biochemical evaluation of *Harungana madagascariensis* Lam aqueous leaf extract in diabetic rats. *International Journal of Natural Sciences* 5(2). 1-11.
101. **Nusgens, P. B., and Colige, D. A. (2008).** L'ADAMTS2 - une métalloprotéase contenant un domaine désintégrine et des motifs thrombospondines de type I - dans la fibrose, la cicatrisation et l'angiogenèse tumorale. *Thèse de Doctorat de l'Université de Liège*, 56p.
102. **Odebiyi, O., and Sofowora, E. (1979).** Antimicrobial Alkaloids from a Nigerian Chewing Stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta Medica* 36, 204–207.
103. **Oh, H.-I., Shim, J.-S., Gwon, S.-H., Kwon, H.-J., and Hwang, J.-K. (2009).** The effect of xanthorrhizol on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type-I procollagen in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *Phytotherapy Research* 23, 1299–1302.
104. **Okada, H. C., Alleyne, B., Varghai, K., Kinder, K., and Guyuron, B. (2013).** Facial Changes Caused by Smoking: A Comparison between Smoking and Nonsmoking Identical Twins. *Plastic and Reconstructive Surgery* 132, 1085–1092.
105. **Oliveira Costa, J. F., Barbosa-Filho, J. M., de Azevedo Maia, G. L., Guimarães, E. T., Meira, C. S., Ribeiro-dos-Santos, R., et al. (2014).** Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. *International Immunopharmacology* 23, 469–474.
106. **O'Neill, L. A. J. (2016).** A Metabolic Roadblock in Inflammatory Macrophages. *Cell Reports* 17, 625–626.
107. **Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., and Simons, A. (2009).** Agroforestry. A tree reference and selection guide, version 4.0. Retrieved July 02, 2012.

108. **Philips, N., Auler, S., Hugo, R., and Gonzalez, S. (2011).** Beneficial Regulation of Matrix Metalloproteinases for Skin Health. *Enzyme Research* 2011, 1–4.
109. **Pietta PG (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production*. 63: 1035-1042
110. **Pillaiyar, T., Manickam, M., and Namasivayam, V. (2017).** Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32, 403–425.
111. **Pittayapruek, P., Meehansan, J., Prapapan, O., Komine, M., and Ohtsuki, M. (2016).** Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 868.
112. **Poljsak, B., Šuput, D., and Milisav, I. (2013).** Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 1–11.
113. **Popoola, O., Marnewick, J., Rautenbach, F., Iwuoha, E., and Hussein, A. (2015).** Acylphloroglucinol Derivatives from the South African *Helichrysum niveum* and Their Biological Activities. *Molecules* 20, 17309–17324.
114. **Rao, A. S., Reddy, S. G., Babu, P. P., and Reddy, A. R. (2010).** The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10.
115. **Rawal, K., Khurana, T., Sharma, H., Verma, S., Gupta, S., Kubba, C., et al. (2019).** An extensive survey of molecular docking tools and their applications using text mining and deep curation strategies. *PeerJ Preprints*. 177p.
116. **Rojo de la Vega, M., Krajisnik, A., Zhang, D., and Wondrak, G. (2017).** Targeting NRF2 for Improved Skin Barrier Function and Photoprotection: Focus on the Achiote-Derived Apocarotenoid Bixin. *Nutrients* 9, 1371.
117. **Ryu, Y. S., Fernando, P. D. S. M., Kang, K. A., Piao, M. J., Zhen, A. X., Kang, H. K., et al. (2019).** Marine Compound 3-Bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde

- Protects Skin Cells against Oxidative Damage via the Nrf2/HO-1 Pathway. *Mar Drugs* 17.
118. Schäfer, M., Willrodt, A., Kurinna, S., Link, A. S., Farwanah, H., Geusau, A., et al. (2014). Activation of Nrf2 in keratinocytes causes chloracne (MADISH)-like skin disease in mice. *EMBO Molecular Medicine* 6, 442–457.
119. Shah, A. A., and Sinha, A. A. (2013). Oxidative stress and autoimmune skin disease. *European Journal of Dermatology* 23, 5–13.
120. Shin, D., Lee, S., Huang, Y.-H., Lim, H.-W., Lee, Y., Jang, K., et al. (2018). Protective properties of geniposide against UV-B-induced photooxidative stress in human dermal fibroblasts. *Pharmaceutical Biology* 56, 176–182.
121. Silva, A. R., Menezes, P. F. C., Martinello, T., Novakovich, G. F. L., Praes, C. E. O., and Feferman, I. H. S. (2010). Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. *International Journal of Cosmetic Science* 32, 73–80.
122. Singh, G. (2009). Can we prevent skin aging? *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 75, 447.
123. Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Singh, N. K., Thadani, J., Patel, P. J., Kumar, J., et al. (2017). Phycoerythrin averts intracellular ROS generation and physiological functional decline in eukaryotes under oxidative stress. *Protoplasma* 254, 849–862.
124. Song, H., Zhang, S., Zhang, L., and Li, B. (2017). Effect of Orally Administered Collagen Peptides from Bovine Bone on Skin Aging in Chronologically Aged Mice. *Nutrients* 9, 1209.
125. Souza, L. C., Antunes, M. S., Filho, C. B., Del Fabbro, L., de Gomes, M. G., Goes, A. T. R., et al. (2015). Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 134, 22–30.

126. **Strober, W. (2001).** “Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability,” in *Current Protocols in Immunology*, eds. J. E. Coligan, B. E. Bierer, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2.
127. **Su, S., and Wink, M. (2015).** Natural lignans from *Arctium lappa* as antiaging agents in *Caenorhabditis elegans*. *Phytochemistry* 117, 340–350.
128. **Su, X.-Y., Wang, Z.-Y., and Liu, J.-R. (2009).** In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 117, 681–686.
129. **Suga, A., Narita, T., Zhou, L., Sakagami, H., Satoh, K., and Wakabayashi, H. (2009).** Inhibition of NO Production in LPS-stimulated Mouse Macrophage-like Cells by Benzo[b]cyclohept[e] [1,4]oxazine and 2-Aminotropone Derivatives. *in vivo* 23, 691-698.
130. **Sultana, N., and Lee, N. H. (2007a).** Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytotherapy Research* 21, 1171–1176.
131. **Sultana, N., and Lee, N. H. (2007b).** Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytotherapy Research* 21, 1171–1176.
132. **Sumiyoshi, M., and Kimura, Y. (2009).** Effects of a turmeric extract (*Curcuma longa*) on chronic ultraviolet B irradiation-induced skin damage in melanin-possessing hairless mice. *Phytomedicine* 16, 1137–1143.
133. **Swalwell, H., Latimer, J., Haywood, R. M., and Birch-Machin, M. A. (2012).** Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* 52, 626–634.
134. **Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Martins, A., Barreiro, M. F., and Ferreira, I. C. F. R. (2016).** Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics A review. *Industrial Crops and Products* 90, 38–48.

135. **Tchakam, P. D., Lunga, P. K., Kowa, T. K., Lonfouo, A. H. N., Wabo, H. K., Tapondjou, L. A., et al. (2012).** Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum* Engl. and *Hypericum lanceolatum* Lam. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12.
136. **Thornton, M. J. (2013).** Estrogens and aging skin. *Dermato-Endocrinology* 5, 264–270.
137. **Thring, T. S., Hili, P., and Naughton, D. P. (2009).** Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9.
138. **Tobin, D. J. (2017).** Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability* 26, 37–46.
139. **Toure (2010).** Les dermatoses courantes de l'adulte au CHU de Gabriel TOURE. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bamako*, 109p.
140. **Ullah, F., Hussain, H., Hussain, J., Bukhari, I. A., Khan, M. T. H., Choudhary, M. I., et al. (2007).** Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron colletianum*. *Phytotherapy Research* 21, 1076–1081.
141. **Videira, I. F. dos S., Moura, D. F. L., and Magina, S. (2013).** Mechanisms regulating melanogenesis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 88, 76–83.
142. **Wiegand, C., Raschke, C., and Elsner, P. (2017).** “Skin Aging: A Brief Summary of Characteristic Changes,” in *Textbook of Aging Skin*, eds. Miranda A. Farage, K. W. Miller, and H. I. Maibach (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 55–65.
143. **Wilkinson, H. N., and Hardman, M. J. (2017).** The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. *Maturitas* 103, 60–64.
144. **Yamaba, H., Haba, M., Kunita, M., Sakaida, T., Tanaka, H., Yashiro, Y., et al. (2016).** Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging. *Experimental Dermatology* 25, 45–51.

145. **Yim, M.-J., Lee, J. M., Choi, G., Lee, D.-S., Park, W. S., Jung, W.-K., et al. (2018).** Anti-Inflammatory Potential of *Carpomitra costata* Ethanolic Extracts via Inhibition of NF- κ B and AP-1 Activation in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018, 1–11.
146. **Zengin, G., Cakmak, Y. S., Guler, G. O., and Aktumsek, A. (2010).** In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2638–2641.
147. **Zhang, S., and Duan, E. (2018).** Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplantation* 27, 729–738.
148. **Zhao, P., Alam, M., and Lee, S.-H. (2018).** Protection of UVB-Induced Photoaging by Fuzhuan-Brick Tea Aqueous Extract via MAPKs/Nrf2-Mediated Down-Regulation of MMP-1. *Nutrients* 11, 60.
149. **Zonunsanga (2015).** Melanocytes and melanogenesis. *Our Dermatology Online* 6.

WEBOGRAPHIE

1. <http://www.pdb.org>, consulté le 14/04/2019 à 15h.
2. <https://www.uniprot.org/uniprot/>, consulté le 25/04/2019 à 08h.
3. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, consulté le 03/05/2019 à 20h.
4. <http://galaxy.seoklab.org/> consulté le 17/05/2019 à 17h.

ANNEXES

Annexe 1 : Procédures de préparation des réactifs tests antioxydant, anti-inflammatoire, anti-élastase et anti-tyrosinase

1 Etude des propriétés antioxydantes

1.1 Piégeage du radical DPPH

- Solution de DPPH 40 µg/ml
 - Peser 0,01 g de DPPH
 - Dissoudre dans le méthanol qsp 250 ml

1.2 Réduction de l'ion ferrique

- Solution tampon phosphate (pH 6,6 ; 0,2mM)
 - ✓ Solution A
 - Peser 17,15g de K₂HPO₄
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
 - ✓ Solution B
 - Peser 13,31 g de KH₂P0₄
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
 - Titrer la solution B à l'aide de la solution A jusqu'au pH 6,6.
- Solution FeCl₃ 0,025% (v/v)
 - Prélever 25µl FeCl₃
 - Diluer dans l'eau distillée qsp 100 ml
- Solution de TCA 10% (p/v)
 - Peser 100 g de TCA
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 1000 ml
- Solution de ferricyanure de potassium 0,25% (p/v)
 - Peser 2,5 g de ferricyanure de potassium

➤ Dissoudre dans l'eau distillée qsp 1000 ml

2 Etude des propriétés anti-inflammatoires

2.1 Inhibition du NO

Kit de réactif Griess pour la détermination de la teneur en nitrite (G-7921)

- Préparation des réactifs

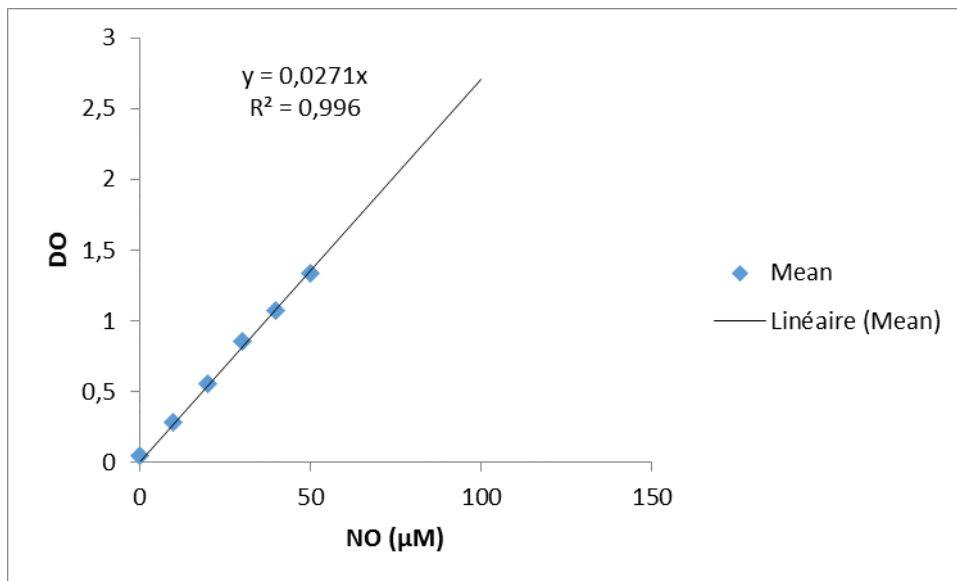
- Solution de N- (1-naphtyl) éthylènediamine Dichlorhydrate (composant A), 25 ml d'une solution à 0,1% (1 mg / ml), scellée sous argon
- Acide sulfanilique (composant B), 25 ml d'une solution à 1% (10 mg / ml) dans de 5% d'acide phosphorique à
- Nitrite standard solution (Component C), 1.0 mL of 1.0 mM sodium nitrite in deionized water
- • Solution standard de nitrite (composant C), 1,0 ml de nitrite de sodium (1mM) dans de l'eau désionisée

- Préparation du réactif de Griess

- Mélanger ensemble des volumes égaux de N- (1-naphtyl) éthylènediamine (composant A) et d'acide sulfanilique (composant B) pour former le réactif de Griess. Préparez suffisamment de réactif pour les expériences. Ne pas stocker plus de 8 heures.

- Calibration du NO

1mM NaNO ₂ (μL)	0	2	4	6	8	10	20
Eau deionisée (μL)	100	98	96	94	92	90	80
Reactif du Griess (μL)	100	100	100	100	100	100	100
Incubation dans le noir pendant 10 minutes et lecture d'absorbance à 550 nm							
Absorbance (550nm)							
[NaNO ₂] (μM)	0	10	20	30	40	50	100



Courbe d'étalonnage de NO

2.2 Inhibition de la 15-lipoxygénase

- tampon borate 2 M (0.2 M); pH 9.00.
- préparer à partir d'acide borique et d'hydroxyde de sodium

Acide borique, MW : 61.83 g/mol

$2 \times 61.83 = 123.66$ g d'acide borique à dissoudre dans qsp 1 L d'eau distillée

- Ajustez le pH avec la solution concentrée de NaOH 10M
 - o Solution de substrat 250 µM
 - o Mélanger 10 µL d'acide linoléique et 30 µL d'éthanol
 - o Ajouter 120 mL de tampon borate
- Préparer cette solution le jour de l'expérience
 - o Solution stock d'enzyme 15-lipoxygénase 10 000 UI / mL

Préparer une solution de travail à 200 UI / mL (400 UI / mL)

- Recueillir 1 ml de la solution mère et mélanger avec 49 ml de tampon borate
- Gardez cette solution dans la glace tout au long de la période expérimentale

3- inhibition de l'activité des enzymes

3.1- inhibition de l'élastase

- Solution C : tampon Tris HCl (pH 8; 0,2M)
 - ✓ Solution A
 - Peser 3,027g de tris
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 300 ml
 - ✓ Solution B : HCl 1 N
 - Prélever 17,32ml de HCL
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 200 ml
 - Titrer la solution A à l'aide de la solution B jusqu'au pH 8.

- Solution enzymatique (élastase 1µg/ml)
 - Introduire 1ml de solution C dans la boîte d'enzyme de 5 mg
 - Laisser dissoudre l'enzyme
 - Prélever 18 µl de cette solution enzymatique
 - Diluer dans la solution C qsp 5 ml

- Solution de NSANA 0,8 mM

Dissoudre 25 mg de NSANA dans 1600 µl de solution C

3.2- inhibition de la tyrosinase

- Solution C : tampon phosphate (pH 6,8 ; 0,1M)
 - ✓ Solution A
 - Peser 8,70 g de K_2HPO_4
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
 - ✓ Solution B
 - Peser 6,65 g de KH_2PO_4

- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
- Titrer la solution A à l'aide de la solution B jusqu'au pH 6,8.
- Solution enzymatique (tyrosinase 31 U)
 - Introduire 1ml de solution C dans la boîte d'enzyme de 25000 U
 - Laisser dissoudre l'enzyme dans la glace pendant 45 min
 - Prelever 18 µl de cette solution enzymatique
 - Diluer dans 1600 µl de la solution C
- Solution de L-tyrosine 1,5 mM
 - Peser 50 mg de L-tyrosine
 - Dissoudre dans la solution C qsp 50 ml
- **Procédure de culture cellulaire**
 - . Mesure à prendre avant de retirer les cellules de l'azote liquide
 - Préparer le milieu de culture : filtrer 50ml de FBS (fetal bovine serum) + 10ml de
 - pénicilline/streptomycine et ajouter les à 500 ml du milieu RPMI
 - Mettre le milieu de culture pendant 10-30 min dans un bain marie chaud à 37 C
 - Mettre la hotte à flux laminaire en marche et la nettoyer avec de l'éthanol 70%
 - Préparer un tube de 50ml contenant 15 ml de milieu
 - Introduire le tube contenant les cellules dans le bain marie et introduire son contenu dans un tube de 50ml
 - Centrifuger le tube pendant 5 min à 1000rpm et éliminer le surnageant
 - Préparer une boîte de culture contenant 15 ml de milieu de culture
 - Resuspendre le culot de cellules dans 5 ml de milieu de culture
 - Introduire les cellules dans la boîte de culture et la placer dans un incubateur

- Vérifier les cellules chaque jour sous un microscope.
- Si les cellules croissent densément, elles sont re-collectées et introduites dans d'autres boîtes de culture.
- Si les cellules sont adhérentes ; enlever le milieu de culture
- Laver les cellules avec 10ml de PBS
- Ajouter 2ml de trypsine dans la boîte de culture et l'introduire dans un incubateur pendant 2-5 min
- Inactiver la trypsine avec un volume de 15ml de milieu de culture
- Introduire le mélange dans un tube de 50ml
- Centrifuger le tube pendant 5min à 1000rpm et éliminer le surnageant
- Préparer des boîtes de culture contenant 15ml de milieu de culture
- Resuspendre le culot dans 5ml de milieu et les introduire dans les boîtes de culture
- Placer les boîtes de culture à l'incubateur

Annexes 2 : Spectres RMN des composés isolés

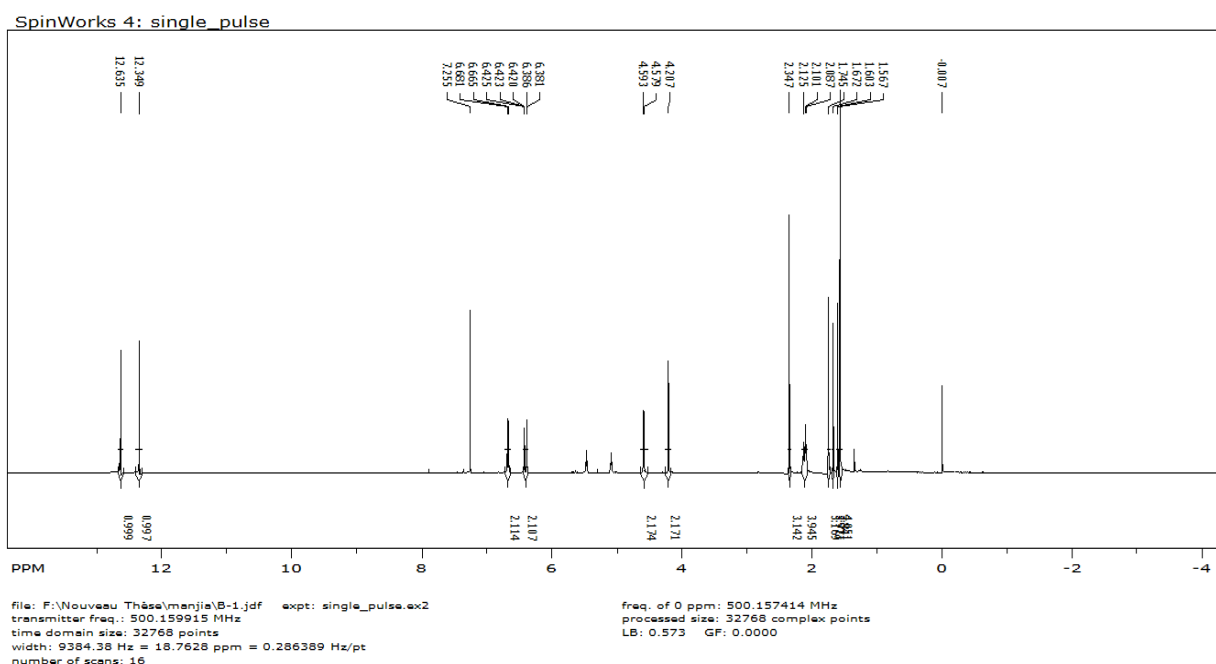


Figure S1 : ^1H NMR du composé **M**: Anthron (3-geranyloxyemodinanthrone)

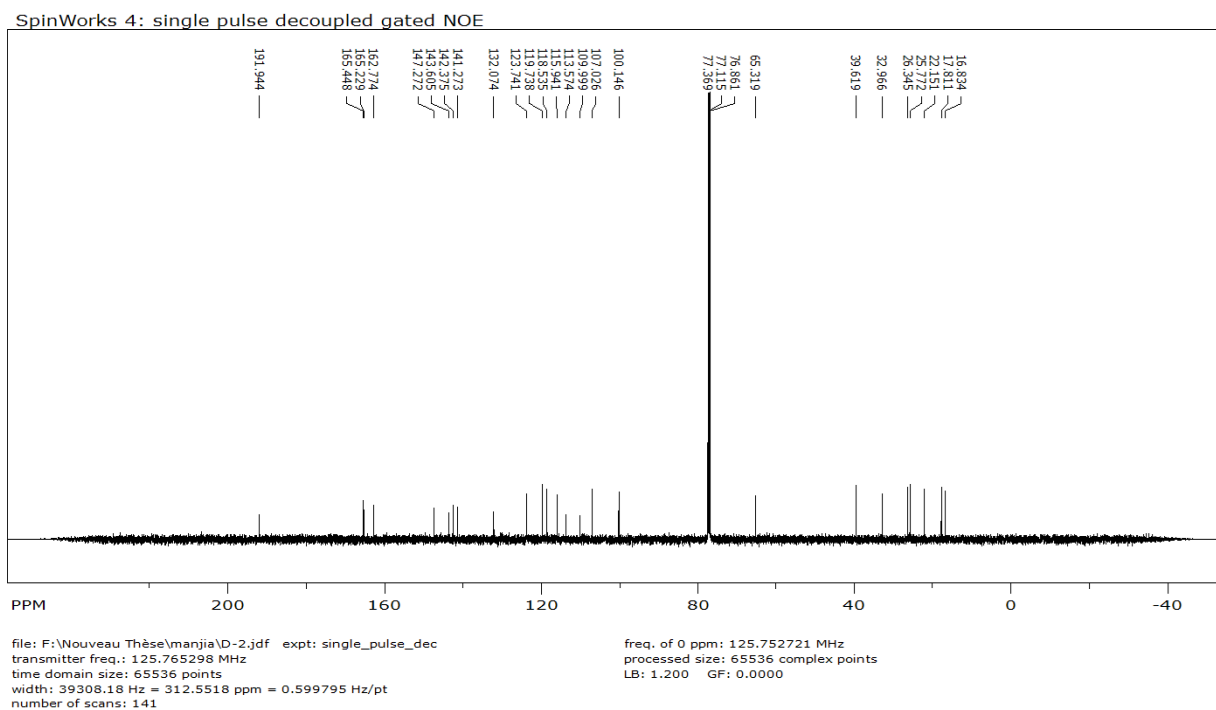


Figure S2: ¹³C NMR of composé M: Antron (3-geranyloxyemodinanthrone)

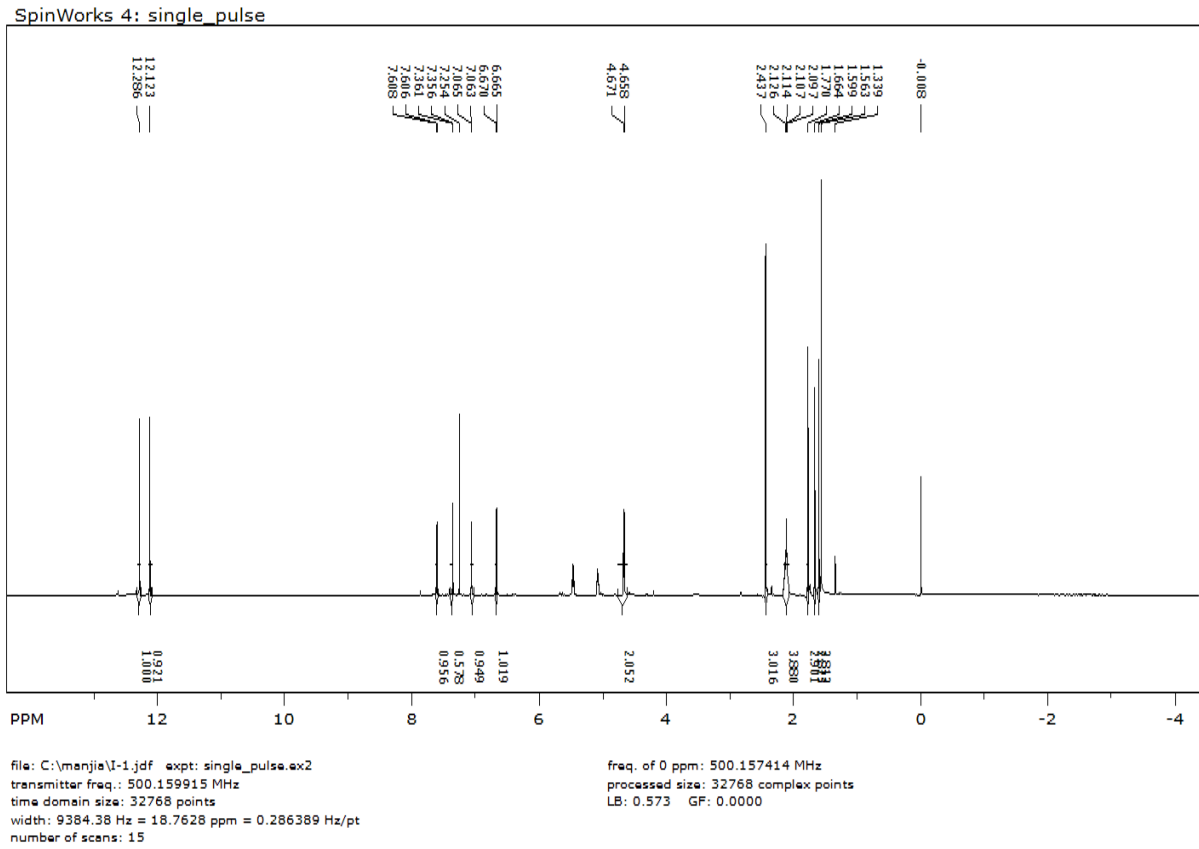


Figure S3: ¹H NMR of composé S: Anthraquinon (3-geranyloxyemodine)

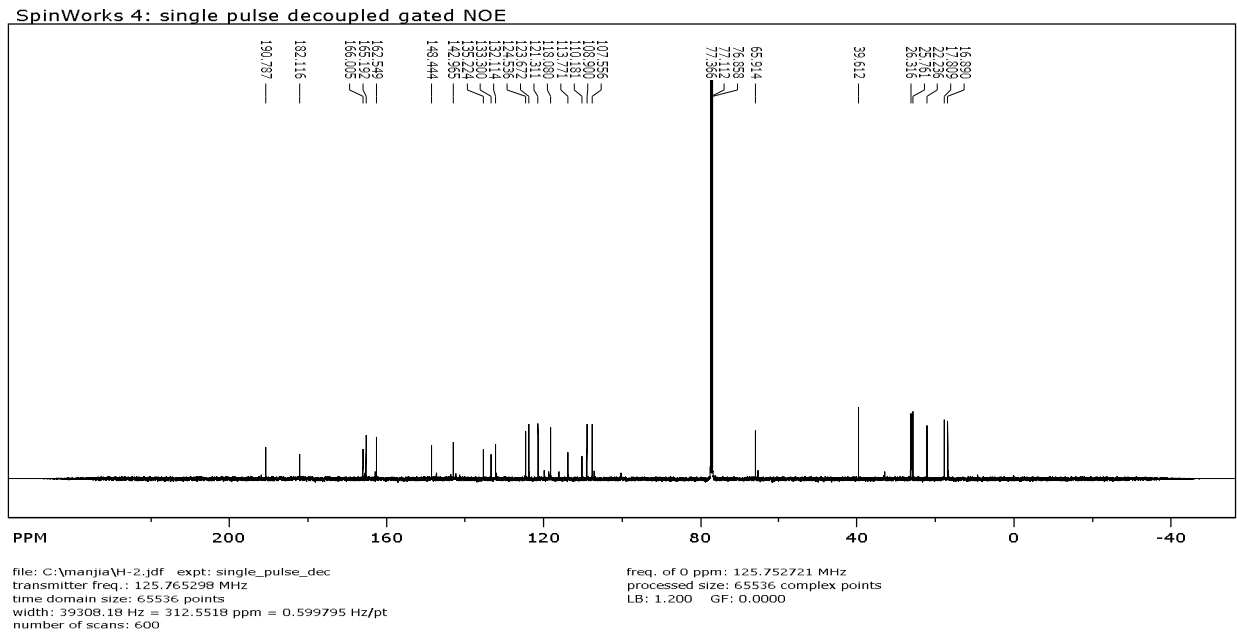


Figure S4: ¹³C NMR of compound S: Anthraquinon (3-geranyloxyemodine)

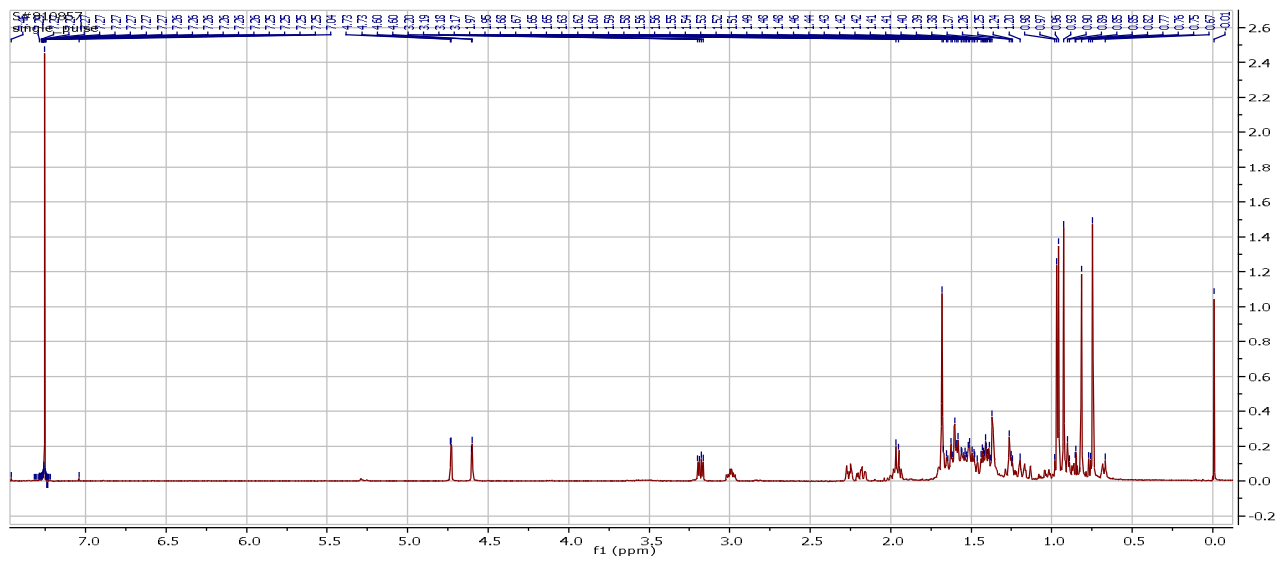


Figure S5 : RMN du composé E Triterpène (lupeol)

**PUBLICATIONS ISSUES DE LA
THESE**

Ce travail de recherche a conduit à la rédaction de deux (02) articles scientifiques dont (01) publié et (01) en cours de finalisation

Jacqueline N. Manjia, Frederic N. Njyou, Apeksha Joshi, Kapil Upadhyay, Kavita shirsath, Ranjitsinh V. devkar and Paul F. moundipa (2019): The anti-aging potential of medicinal plants in Cameroon -*Harungana madagascariensis* Lam. and *Psorospermum aurantiacum* Engl. prevent in vitro ultravioletB light-induced skin damage, *European Journal of Integrative Medicine*, <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.05.011>.

Jacqueline N. Manjia, Apeksha Joshi, Emmanuel Mfotie Njoya, Kapil Upadhyay, Lyndy J. McGaw, Ranjitsinh V. Devkar, Frederic N. Njyou* and Paul F. Moundipa: Two isolated fractions from *Harungana madagascariensis* Lam. and *Psorospermum aurantiacum* Engl. prevent UVB-induced photoaging in mice fibroblast and melanoma cells. *Under preparation*



Research paper

The anti-aging potential of medicinal plants in Cameroon - *Harungana madagascariensis* Lam. and *Psorospermum aurantiacum* Engl. prevent in vitro ultraviolet B light-induced skin damage



Jacqueline Manjia N.^{a,b}, Frederic Njayou N.^{a,*}, Apeksha Joshi^b, Kapil Upadhyay^b, Kavita Shirsath^b, Ranjitsinh Devkar V.^b, Paul Moundipa F.^a

^a Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of science, University of Yaoundé I, PO. Box 812 Yaoundé, Cameroon

^b Division of Phytotherapeutics and Metabolic Endocrinology, Department of Zoology, Faculty of Science, The Maharaja Sayajirao University of Baroda, Vadodara, 390002, India

ARTICLE INFO

Keywords:

Medicinal plants
Cameroon
Anti-Aging
Antioxidant
Anti-Elastase
Anti-Tyrosinase

ABSTRACT

Introduction: Plants are used by the populations of Fouban (West Region) and Nkol Anga'a (Center Region) for skin care in Cameroon, Central Africa. In this study, the anti-aging potential of the medicinal plants were investigated by evaluating their *in vitro* antioxidant, anti-elastase and anti-tyrosinase activities followed by the analysis of their protective effect on ultraviolet B light-induced oxidative stress.

Methods: Antioxidant potential to scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and hydrogen-hydroxyl (OH[•]), reduce potassium ferrocyanate and phosphomolybdenum and inhibit lipid peroxidation (LP) was assessed while the anti-elastase and anti-tyrosinase activities were determined spectrophotometrically. The protective potential of the most active extracts were determined on ultraviolet B light-induced oxidative stress in fibroblasts and melanoma cells by measuring the mRNA levels of Nrf-2 and HO-1

Results: Twenty-six medicinal plants species belonging to sixteen families were stock-listed. The crude extracts of *Harungana madagascariensis* and *Psorospermum aurantiacum* possessed high total polyphenol content. Likewise, the antioxidant activity of both plants was comparable to that of ascorbic acid in all the studied oxidative models. Tested at 100 µg/mL, these extracts were found to inhibit the activity of elastase at 100 and 77.58% respectively. Both extracts exhibited low inhibitory activity on tyrosinase as compared to ascorbic acid while the isolated hexane and methanol fractions demonstrated strong antioxidative activities. The hexane fraction of *P. aurantiacum* induced significant ($p < 0.01$) up-regulation of antioxidant genes (Nrf-2 and HO-1).

Conclusion: The above cited plants exhibited high antioxidative, anti-tyrosinase and anti-elastase activities and, their active compounds may be promising for skin care.

1. Introduction

Human skin is constantly exposed to by microorganisms, chronic light exposure, pollution, ionizing radiation, chemicals, and toxins that produce reactive oxygen species (ROS) and that inevitably result in detrimental outcomes which can speed up skin aging [1,2]. Skin aging is a complex mechanism characterize by a loss of skin elasticity and strength as well as development of pigmentation disorders, acnes and pimples [3,4]. Moreover, hyperpigmentation, deterioration of collagen

and elastin fibers resulting in wrinkles, laxity, skin dryness, poor wound healing [5] has been attributed to up-regulation of tyrosinase, collagenase and elastase, respectively [6,7]. Such skin appearances are the result of oxidative stress due to skin exposure to sun UV-B (280–320 nm) [4]. To efficiently counteract reactive oxygen species (ROS), skin cells are equipped with special elements such as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2). Nrf-2 that is involved in the regulation of antioxidant genes (heme oxygenase- 1 (HO-1), superoxide dismutase, catalase...). However overproduction of ROS impairs the

Abbreviations: PA, psorospermum.aurantiacum; HM, harungana madagascariensis; Nrf-2, nuclear factor Erythroid 2-related factor 2; HO-1, heme oxygenase-1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; DMSO, dimethyl sulfoxide

* Corresponding author.

E-mail addresses: jmanjia@gmail.com (J. Manjia N.), njayou@yahoo.com (F. Njayou N.), apekshajoshi134@gmail.com (A. Joshi), kplupadhyay192@gmail.com (K. Upadhyay), kavitashirsath04@gmail.com (K. Shirsath), rv.devkar-zoo@msubaroda.ac.in (R. Devkar V.), pmoundipa@hotmail.com (P. Moundipa F.).

<https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.05.011>

Received 30 March 2019; Received in revised form 24 May 2019; Accepted 24 May 2019

1876-3820/ © 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

good functioning of these antioxidant genes [3].

Topical bleaching agents such as hydroquinone, kojic acid, arbutin and azelaic acid can reduce signs of skin aging but have also been reported for their inefficiency and side effects [8,10]. Therefore, the need for discovery and development of new strategies to halt skin aging has become highly evident. Natural compounds are known as activators of antioxidant genes offering protection against UV-induced cytotoxicity [3,4]. Thus, the skin anti-aging abilities of the extracts has been reported by several research groups. In this regard, green tea polyphenols and fruit of *P. strobilacea* were shown to prevent oxidative damage, anti-elastase property in several experimental models [8,9]. Caffeic acid and quercetin have also been reported to reduce oxidative stress and inhibit tyrosinase [11]. Ellagic acid has been found to suppress oxidative stress and up regulate Nrf-2 and HO-1 in human skin cells [12]. Effective compounds with minimal side effects remain scarce and hence screening of other natural products for potential anti-skin aging activity is much needed.

In this perspective, an ethnopharmacological survey was carried out amongst local communities and traditional healers in Cameroon to collect medicinal plants used for skin care. These plants were screened *in vitro* for their anti-skin aging activities including antioxidant, anti-tyrosinase and anti-elastase activities. Then, the most active extracts were selected, fractionated and, fractions assessed for their effects on antioxidant genes and experimentally induced intracellular oxidative stress in fibroblast and melanoma cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Elastase (type VI), N-Suc-(Ala)₃-P-nitroanilide (sucAla₃-PNA), Tyrosinase, L-tyrosine, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate, ferrozine, ferrous sulfate, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, ferric chloride, sodium nitroprusside, L-ascorbic acid, Folin-Ciocalteu reagent, were purchased from Prolabo (Paris, France) and Sigma-Aldrich chemical company (Hamburg, Germany). All chemicals of molecular biology grade were purchased commercially. Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sisco Research Laboratory Pvt. Ltd. (Mumbai, India). Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin phosphate versene glucose (TPVG) and antibiotic-antimycotic solution were purchased from Hi-media Laboratories (Mumbai, India). TRIzol reagent, DreamTaq and Green master mix were procured from Invitrogen (CA, USA). iScript cDNA synthesis kit was purchased from Bio-Rad (CA, USA). Skin mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) and skin mouse melanoma (B16F10) were procured from National Centre for Cell Science (NCCS, Pune, India).

2.2. Ethnopharmacological survey, plant collection and extraction

The symphony between the indigenous populations and their traditional practice such as herbal therapy led us to identify the localities in Cameroon namely Fouban and Nkol Anga'a as our study areas. A total of 32 healers were surveyed in both of the study areas (20 in Fouban in the West region and 12 in Nkol'Anga in the Centre region). A survey was conducted in August 2011 after prior consent of interviewers and with a clause that information gathered was purely for scientific studies and not for any commercial use. The current study was approved in accordance to the regulations of the Graduate School from the University of Yaoundé I (Cameroon). Participants who freely accepted to share their traditional knowledge on herbal medicine with our research team were selected and interviewed. Each individual was administered a questionnaire, and the answers to questions were completed by the participant or by our team member in accordance with his statement based on their degree of literacy. The participants

were either traditional healers or elderly people who had the experience of using medicinal plants for skin care. Information on local names and traditional description of the medicinal plant species, parts of plants used, preparation methods, administration methods and their therapeutic efficacies were obtained through the survey. Plants identified by the person interviewed were harvested in the same area, photographed and labeled specimens for the herbarium were prepared. At the end of the investigation, the specimens were transported to the National Herbarium of Cameroon in Yaoundé (HNC) for identification.

Aerial plant parts (stem, barks and leaves) were harvested between 6 and 11 a.m. in Fouban and Nkol Anga'a washed with clean water, shade dried at room temperature, grinded, packed, stored at -20°C and then analyzed separately. Due to the fact that participants used various solvents and methods, our team adopted to use mixture of methylene chloride-methanol (1: 1 v / v) as the common extraction solvent. Thus, 50 g of powder of each plant part was macerated in this solvent for 24 h while stirring at regular intervals and filtered (Whatman No. 1 filter paper). The filtrates obtained were concentrated under vacuum by a rotary evaporator (Heidolph WB 2000). Based on their good biological activities potential, two plant extracts were selected and fractionated by liquid-liquid partitioning using hexane, methylene chloride, ethyl acetate and methanol. After calculating the yields, the evaporated extracts and fractions were then stored at -20°C for the further experiments.

2.3. Antioxidant assays

All the plant extracts were tested at final concentrations of 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3.1. Ferrous reducing power assay

The reducing power of plant samples was assessed as described by (Patil et al., 2009). A volume of 50 μL of each plant extract was added to 1.1 mL of phosphate buffer (0.6 M, pH 6.6) and 1 mL of potassium ferrocyanate [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (0.25%). After incubation for 20 min at 50°C , 1 mL of trichloroacetic acid (TCA) (10%) was added and the mixture was centrifuged (3000 rpm, 10 min, 4°C). The supernatant collected was mixed with 1 mL of distilled water and 0.2 mL of ferrichloride (1%). The mixture was well homogenized and allowed to stand for 10 min at room temperature. The absorbance was measured at 700 nm against a blank solution. Ascorbic acid was used as positive control.

2.3.2. Total antioxidant capacity assay

Determination of total antioxidant capacity was done by the phosphomolybdenum method as reported by (Kumar and Hemalatha, 2011). The tubes containing the plant extracts and reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate) were incubated at 95°C for 90 min. After the mixture has cooled to room temperature, the absorbance of each solution was measured at 695 nm against a blank. The antioxidant capacity was expressed as ascorbic acid equivalent (AAE/g of extract).

2.3.3. Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) radical scavenging assay

The free radical-scavenging (DPPH \cdot) activity of the plant extracts was measured according to the method of [13]. A volume of 3.1 mL of freshly prepared DPPH (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in pure methanol was mixed with 50 μL of the test sample to achieve the desired concentration. The mixture was shaken vigorously and incubated for 30 min in the dark at room temperature. The absorbance was recorded at 517 nm against a blank. Control samples contained the same volume of solvent without the plant extract (or ascorbic acid as positive control). The percentage of DPPH scavenging activity was calculated according to the Eq. (1) below and used for half scavenging concentration (SC_{50}).

$$\text{Inhibition \%} = \frac{[A_0 - (A_2 - A_1)]}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

Where A_0 is the absorbance of the incubated DPPH \cdot solution without addition of the sample or positive controls, A_1 is the absorbance of the sample without DPPH \cdot Solution and A_2 is the absorbance of the incubation mixture containing both the test sample and DPPH \cdot solutions.

2.3.4. Hydroxyl (OH \cdot) radical scavenging assay

Hydroxyl radical scavenging assay was performed according to the method described by [14]. The reaction mixture consisted of 50 μ L of each plant extract, 0.7 mL of Fe $_2$ SO $_4$ (3 mM), 1 mL of H $_2$ O $_2$ (1 mM), 1 mL of distilled water and 0.4 mL of sodium salicylate (10 mM). The mixture was then incubated at 37 $^\circ$ C for 1 h, and the absorbance measured at 562 nm. The scavenging activity was calculated using the formula described in the Eq. (1) above.

2.3.5. Lipid peroxidation assay

The inhibition of lipid peroxidation by plant extracts and ascorbic acid was determined according to the thiobarbituric acid method. FeCl $_2$ -H $_2$ O was used to induce lipid peroxidation in liver homogenates [14]. Each plant extract was mixed with 1.0 mL of a 10% liver homogenate, and then, an appropriate volume of Fe $_2$ Cl $_2$ (0.5 mM) and H $_2$ O (0.5 mM) was added. The mixture was incubated at 37 $^\circ$ C for 60 min, and then, 1.0 mL each of trichloroacetic acid (15%) and thiobarbituric acid (0.67%) were added, and the mixture was heated to 100 $^\circ$ C for 15 min. After centrifugation (3500 rpm, 5 min), the absorbance of the supernatant was recorded at 532 nm. The inhibition percentage was calculated according to the Eq. (1) mentioned above.

2.4. Elastase inhibitory assay

A preliminary test was carried out to determine the linear zone where the initial velocities could be calculated and this was found to be in the interval of 60–180 seconds (data not shown). The enzyme activity was measured in the presence or absence of inhibitor (vitamin C) or the test extracts. The activity of porcine pancreatic elastase was examined using N-Suc-(Ala) 3-P-nitroanilide (sucAla3-PNA) as substrate. The release of P-nitroaniline was measured spectrophotometrically at 410 nm as described by [15]. Briefly, the reaction was carried out in a volume of 780 μ L of Tris-HCl buffer (pH 8.0, 0.2 M), 50 μ L of plant extract and 50 μ L of elastase solution (1 μ g/mL), the blank tubes contained the buffer instead of enzyme. The reaction mixture was pre-incubated for 15 min at 25 $^\circ$ C before adding 20 μ L of sucAla3-PNA (0.8 mM) and then homogenized by inversion. The change in absorbance of the mixture was monitored at 410 nm and the absorbance was measured every 15 s for 5 min. The initial rates of hydrolysis of the substrate by the enzyme were calculated in the linear zone and the inhibition percentages were determined according to the formula of the Eq. (2) below.

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (2)$$

Where A is absorbance without plant extract, and B is the change in absorbance in presence of plant extract.

2.5. Tyrosinase inhibitory assay

Each plant extract was assayed for tyrosinase inhibitory activity by using the method described by [16] with some slight modifications. The reaction was carried out in 500 μ L of phosphate buffer (pH 6.8, 0.1 M), 250 μ L of L-tyrosine (1.5 mM). After preincubation for 15 min at 37 $^\circ$ C, 50 μ L of plant extract and 100 μ L of mushroom tyrosinase (31 units/mL) maintained at 37 $^\circ$ C were added. The blank contained the buffer instead of the enzyme. The mixture was incubated for 45 min at 25 $^\circ$ C. The absorbance of the mixture was read at 490 nm against blank. The inhibition percentage was calculated according to the formula above (Eq. (2)).

2.6. Determination of total phenolic content (TPC) and phytochemical screening

The total phenolic content was analyzed according to the Folin-Ciocalteu method as described by [17]. Briefly, 50 μ L of tested samples was mixed with 2.4 mL of distilled water, and 200 μ L of Folin-Ciocalteu's reagent (1/10) were added to 500 μ L of Na $_2$ CO $_3$ 20%. The reaction mixture was incubated at 25 $^\circ$ C for 40 min, and the absorbance read at 725 nm. The results were compared to a chlorogenic acid calibration curve, and the total phenolic content was expressed as milligrams of chlorogenic acid equivalents (CAEs) per gram of extract.

Phytochemical screening of the different fractions was performed according to a procedure described by [18,19]

2.7. Determination of half inhibitory concentration (IC $_{50}$) of plant extracts and correlations between phenolic content with antioxidant potency

IC $_{50}$ values were automatically calculated by using the software STATGRAPHICS 5.0 plus. Correlation between total phenolic content of fractions and their antioxidant activity were determined using the Microsoft Excel 2007, and the coefficient of correlation (r^2) value was deduced from the graph.

2.8. Cell culture and treatment

Fibroblast (NIH/3T3) and Melanoma (B16F10) cells were cultured in DMEM (10% FBS and 1% antibiotic antimycotic solution) at 37 $^\circ$ C in 5% CO $_2$ in air atmosphere. Cells were trypsinized using 1 ml of trypsin-EDTA (0.25%W/V and 0.53 mM) and sub-cultured every two or three days. The study was grouped as Control (untreated cells), UV-B control (UV-B irradiated cells), positive control (UV-B irradiated cells + ascorbic acid) and UV-B-irradiated cell + plant fraction. A stock solution of plant fraction was prepared in [DMSO: phosphate-buff; er saline (PBS)] (0.5–1%) at a concentration of 1000 μ g/mL, and the solution was filtered through 0.22 μ m filter membrane. The final concentrations (100, 50, 25, 12.5 μ g/mL) were achieved by dilution with culture medium.

2.9. Cell viability assay

The cytotoxicity of plant extracts toward NIH/3T3 Fibroblast and Melanoma B16F10 cells was determined using 2-(2, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay according to [20] with slight modifications. A cell suspension containing 10 5 cells were plated in 96-well plates in 100 μ L growth media and left overnight. The cells were exposed to various concentrations of plant fractions for 24 h. 100 μ L MTT of 5 mg/mL concentration was added to each well and after 4 h of incubation at 37 $^\circ$ C the supernatant was removed. The remaining purple formazan crystals were dissolved in 150 μ L of dimethyl sulfoxide. Plates were gently shaken for 15 min at room temperature. Absorbance was measured at 540 nm using ELX800 universal Microplate Readers (Bio-Tek instruments, Inc., Winooski, VT). Cell viability at each concentration of plant extracts was determined by comparison with the negative control without plant extract. After cell viability calculation, the concentration of plant extract which showed at least 80–100% of viability was selected to perform further experiments.

2.10. Intracellular oxidative stress assay

The effect of crude extract and fractions on ROS production in B16F10 and NIH/3T3 induced by UVB was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and following previously described procedures of [4]. Cells were grown at 5 \times 10 5 cells per well in a 6-well plate with 2000 μ L of supplemented medium overnight. The medium was removed, and cells were treated with crude extract and

fractions for 2 h in FBS-free medium. Then, the cells were irradiated at a dose of 39.6 and 29.7 mJ/cm² for B16F10 and NIH/3T3 respectively, and they were incubated at 37 °C for 15 min. DCFDA was added (25 μM) in FBS-free medium and cells were incubated for additional 15 min at 37 °C in a CO₂ incubator. Finally, the cells were washed twice with PBS and images were taken on fluid cell imaging station (Life Technologies, USA). The images were analyzed using image J software.

2.11. Anti-oxidant gene mRNA level modulation studies

Cells (5 × 10⁵ per well) were seeded in 6 well plates with fresh complete culture medium for 24 h. The cells were pre-treated with various concentrations of plant fraction for 2 h followed by UVB exposure and incubated for further 24 h. After treatment, total RNA was extracted from cells using TRIzol Reagent according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were determined by reading the absorbance at 260 and 280 nm by using spectrophotometer (Thermo Scientific). The 260/280 ratio of our RNA preparation ranged from 1.8 to 2.1. Total RNA (1 μg) was reverse transcribed using iScript cDNA Synthesis kit as described by the manufacturer. Semi-quantitative PCR was used for analysis the mRNA levels of target genes. GAPDH was used as an internal control. The sequences of all primers used in this study are presented in the Table 1. All primers of interest genes were synthesized by TSINGKE Biological Technology Company (Beijing, China).

2.12. Statistical analysis

Data analysis was carried out using the GraphPad Instat 3.0 software. The Kolmogorov test was used to verify the normality of the values. For normal distribution, the one-way analysis of variance (ANOVA) test was used. The results were expressed as mean ± SEM of three independent experiments run in duplicate. The difference was significant when p < 0.01. For gene expression, data were presented as mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA using Graph Pad Prism 6.0 (CA, USA) followed by Dunnett's multiple comparisons test. Results were considered to be significant when p < 0.05.

3. Results

3.1. Plant survey and identification

From the survey, twenty-six plants with medicinal potential used against skin affections were collected, identified belonging to sixteen different plant families. These plants are listed in alphabetical order and per family in Table 2. Each plant has its available National Herbarium reference number. In addition, other information regarding the part of the plant used, method of preparation, dosage and yield of the preparation of its extract is enlisted.

3.2. Antioxidant activities

The antioxidant activity was evaluated by testing the reducing power, the antioxidant power of extracts, and also by evaluating their ability to scavenge the DPPH°, OH° radicals and to inhibit lipid peroxidation. A qualitative screening of phytochemical composition of

extracts was done and the quantification of the total phenolic content was also determined.

3.2.1. Reducing power of plant extracts

It resulted that the reducing ability of all plant extracts increased in a concentration-dependent manner (data not shown). The extracts of *H. madagascariensis* (1.48 ± 0.02), *B. micrantha* (1.49 ± 0.02) and *P. aurantiacum* (1.43 ± 0.02) at a concentration 100 μg/mL showed greater reduction ability than ascorbic acid (1.41 ± 0.04) as shown in Table 3.

3.2.2. Total antioxidant capacity of plant extracts

The total antioxidant capacity of the plant extracts, expressed as equivalents of ascorbic acid per gram of extract (AAE /g of extract) is ranged from 33.09 ± 0.35 to 218.25 ± 2.16 mg of AAE / g of extract and shown in Table 3. All the extracts showed an increase in antioxidant capacity with increasing concentrations. At 100 μg/mL, it was found that the total antioxidant capacity was higher with the extracts of *H. madagascariensis* (212.17 ± 4.58 AAE /g extract) and *B. micrantha* (218.25 ± 2.16 AAE /g extract).

3.2.3. Antiradical activity of extracts

The concentration required to scavenge radical at 50% (IC₅₀) of plant extracts is presented in Table 3. It was found that the extract of *H. madagascariensis* exhibited the highest DPPH radical scavenging activity with SC50 of 3.20 ± 0.01 μg/mL compared to ascorbic acid 3.40 ± 0.03 μg/mL. On the other hand, the extracts of *C. odorata* (26.30 ± 6.08 μg/mL), *P. aurantiacum* (29.70 ± 5.37 μg/mL), *A. vera* (29.90 ± 1.13 μg/mL); *A. africana* (30.60 ± 0.01 μg/mL), *H. madagascariensis* (31.30 ± 0.01 μg/mL) and *S. alata* (32.85 ± 6.01 μg/mL) showed good hydroxyl radical scavenging activities similar to that of ascorbic acid (30.80 ± 0.01 μg/mL).

3.3. Inhibitory effect of crude extracts on lipid peroxidation

All the plant extracts effectively inhibited the lipid peroxidation in a concentration-dependent manner (data not shown). Extracts of *P. umbellatum* (8.15 ± 0.21 μg/mL), *H. madagascariensis* (9.35 ± 0.21 μg/mL), *A. africana* (9.90 ± 0.01 μg/mL) and *P. aurantiacum* (10.80 ± 0.01 μg/mL) showed low IC₅₀ compared to ascorbic acid (19.50 ± 2.12 μg/mL) (Table 3).

3.4. Inhibitory effect of crude extract on elastase and tyrosinase

The inhibitory effect of 26 plant extracts on tyrosinase and elastase is shown in Table 4.

Highest elastase inhibition percentages were found with *P. aurantiacum* (77.58 ± 0.23%) and *H. madagascariensis* (100 ± 0.01%) extracts compared to others plant extracts. Similarly, *A. vera* (IC₅₀ = 50.07 μg/mL) strongly inhibited the activity of tyrosinase less than ascorbic acid (IC₅₀ = 6.20 μg/mL)

3.5. Phytochemical compounds and total phenolic content of plant extracts

Several classes of phytochemicals constituents have been detected in twenty-seven extracts as: flavonoids, triterpenes, tannins, alkaloids,

Table 1
Primers for semi-quantitative PCR.

Gene Name	Accession number	Forward Primer (5'-3')	ReversePrimer (5'-3')	Product length
Nrf-2	NM_010902.4	AAGAATAAAGTCGCCGCCA	AGATACAAGGTGCTGAGCCG	170
HO-1	NM_010442.2	GAATCGAGCAGAACCAGCCT	CTCAGCATTCTCGGCTTGGA	135
GAPDH	NM_017008.4	GTCGGTGTGAACGGATTGG	AGATGCCTGCTCCCATCT	192

Nrf-2: Nuclear factor Erythroid 2-related factor 2; HO-1: Heme oxygenase-1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Table 2
Medicinal plants used for skin care by populations of Fomban (West Region Cameroon) and Nkol Anga'a (Center Region, Cameroon).

Family	Scientific name	Voucher Specimen Number	Vernacular names		Part(s) used	Mode of preparation and dose	Skin affections treated	Yield (%)
			Bamoun	Beti				
Acanthaceae	<i>Eremomastax speciosa</i> (hochst) Cufod 24182/ SFR/ cam		Pâ - nkwen		Leaves	Leaves are soaked in water and is taken internally two or three times a day	Skin allergy and Pimples	5,72
	<i>Acanthus montanus</i> 26 004/SFR/cam		fonzap	Ndoue	Leaves	The juice of crushed leaves is applied topically	Pimples and Itching	5,98
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i> Lin 6575 SFRK		Mejó téfú	Nyat lhouak	Stems and Leaves	The juice of leaves and stems is applied topically and decoction is taken orally	Cuts to stop bleeding and Pimples	7,48
	<i>Aspilia africana</i> (per.) CD Adams 16 478/ SFR/ cam		wa'wa'	Lyaigue dzié	Leaves and Stems	The juice of crushed leaves and stems is applied topically	Wounds and cut to get quick relief	5,24
	<i>Dichrocephala integrifolia</i> (Lin.) O.Ktze16641/ SFR/cam		Yière	koukouta	Leaves	The juice of crushed leaves is applied topically	Wounds and Sores	0,66
	<i>Emilia coccinea</i> (sims.) G.Don 29441/NHC		Shin mú	Aloa mvou	Leaves	The leaf of juice of is applied topically	Healing of wounds	6,60
	<i>Sonchus oleraceus</i> Lin 44928/NHC		Melile ntam-ntam	Ta'a bekon	Leaves	The juice of crushed leaves is applied topically	pimples	3,34
	<i>Chromolaena Odorata</i>		Be jamais	Ndogmou	Leaves	The paste of leaves is applied topically	Cuts and wounds to stop bleeding	8,12
Crasulaceae	<i>Kalanchoe crenata</i> (Andr.) Haw 35196/NHC		Má-tut	Nkondengui	Leaves	Decoction of leaves is taken orally twice a day	Pimples	3,00
Cesalpiniaceae	<i>Senna alata</i> (Lin.) Link 29494/NHC		Sùe'nása	Adog Ngome	Leaves	Leaves is crushed with a little quantity of salt and applied topically	Scurf	12,68
Commelinaceae	<i>Commelina</i> SP.		Gou gouete	Nkarnin	Sap	The sap is applied topically	Ringworm and on scalp to avoid baldness	2,16
Euphorboraceae	<i>Bridelia micrantha</i> 38578/NHC			Iwolode	Bark	Decoction of bark is used to bath and is also taken internally twice a day	Pimples	1,44
Fabaceae	<i>Mucuna pruriens</i> (Linn) DC 42582/NHC			Akon	Leaves	The infusion of leaves is taken orally	Pimples and skin allergy	8,22
Hypericaceae	<i>Phaseolus lunatus</i> Linn 42652/NHC		Joubiere		Whole plant	The whole plant paste is applied on scalp	Dandruff	7,08
	<i>Harungana madagascaris</i> Lam 22866/SFR/ cam		Túne	Atondo	Bark and Stem	The bark and Stem are burnt and ash is applied topically	Skin irritation	28,32 (Barks)
	<i>Psorospermum aurantiacum</i> 16855/SFR/ cam		Má bane		Leaves and bark	Decoction of bark and leaves is taken orally	Pimples	6,12
Liliaceae	<i>Aloe vera</i>				Gel	The gel is applied topically	Skin dryness	4,88
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i> linn41749/NHC		Sisem	Zizin	Leaves	The paste of leaves is applied topically	wounds	10,98
Mimosaceae	<i>Albizia gummifera</i> 13,224 /SFR/ cam		Pá		Leaves	The crushed of leaves is used like soap for the bath	Skin dryness and skin allergy	5,20
Moraceae	<i>Ficus exasperata</i> Vahl.		Ghughu	Akole	Leaves	Decoction of leaves is taken orally	Pimples and eczema	1,08
Piperaceae	<i>Piper umbellatum</i> 20 934/SFR/ cam		Boupouete	Aboam zana	Leaves	The crushed of leaves is applied topically	Pimples	8,82
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> (Linn.)17542/SFR/ cam		Keptigup		Leaves	The crushed of leaves is applied topically	wound	9,28
Rubiaceae	<i>Spermacoe latifolia</i> (Aubl) K.Schum 28331/ SFR/cam				Leaves	The paste of leave is applied topically	Disorders pigmentation	4,84
Solanaceae	<i>Mitracarpus scaber</i> 21049/SFR/ cam		kükúte	Oyen Ze'e	Leaves	The paste of leave is applied topically	Disorders pigmentation	2,42
	<i>Solanum aculeastrum</i> dunal 25878/SFR/ cam			Ozezan komba	Fruits	The fruit is burnt and ash is mixed with oil and applied topically	Disorders pigmentation	10,84
	<i>Capsicum frutescens</i> L.10737/SFR/ cam		Yuwuo 'metu	Ndodo'o	Leaves	The Leaves and fruit are ground and its paste is applied topically	Wounds for quick relief	14,86

Table 3
Antioxidant activities of some Cameroonian medicinal plants used traditionally for skin care.

Scientific name	DPPH [•] SC50 (µg/mL)	HO [•] SC50 (µg/mL)	RPA (OD at 700 nm)	TAC (mg AAE/g)	LP IC50 (µg/mL)
<i>Eremomastax speciosa</i>	84.85 ± 1.06 ^b	> 100	0.39 ± 0.00	85.41 ± 1.47	> 100
<i>Acanthus montanus</i>	> 100	> 100	0.11 ± 0.02	52.81 ± 0.09	> 100
<i>Ageratum conyzoides</i>	> 100	95.35 ± 2.47 ^b	0.23 ± 0.00	91.58 ± 1.55	98.6 ± 0.00 ^b
<i>Aspilia africana</i>	> 100	30.60 ± 0.00 ^a	0.34 ± 0.05	77.66 ± 1.38	9.90 ± 0.00 ^b
<i>Dichrocephala integrifolia</i>	> 100	> 100	0.12 ± 0.00	84.25 ± 3.8	> 100
<i>Emilia coccinia</i>	> 100	> 100	0.23 ± 0.02	119.54 ± 2.24	> 100
<i>Sonchus oleraceus</i>	> 100	> 100	0.15 ± 0.02	33.09 ± 0.35	> 100
<i>Chromolena Odorata</i>	> 100	26.30 ± 6.08 ^a	0.57 ± 0.01	90.6 ± 3.97	39.10 ± 9.48 ^b
<i>Kalonchoe crenata</i>	> 100	> 100	0.40 ± 0.02	99.45 ± 4.75	> 100
<i>Senna alata</i>	42.20 ± 2.40 ^b	32.85 ± 6.01 ^a	1.39 ± 0.00	115.57 ± 5.97	44.85 ± 1.77 ^b
<i>Commelina SP.</i>	> 100	> 100	0.15 ± 0.01	46.76 ± 0.86	> 100
<i>Bridelia micrantha</i>	33.85 ± 1.77 ^b	48.25 ± 1.06 ^b	1.49 ± 0.02	218.25 ± 2.16	87.75 ± 0.64 ^b
<i>Mucuna pruriens</i>	> 100	87.90 ± 3.82 ^b	0.39 ± 0.01	75.46 ± 1.21	> 100
<i>Phaseolus lunatus</i>	> 100	> 100	0.10 ± 0.01	68.13 ± 1.73	> 100
<i>Harungana madagascariensis</i>	3.20 ± 0.00 ^a	31.30 ± 0.00 ^a	1.48 ± 0.02	212.27 ± 4.58	9.35 ± 0.21 ^b
<i>Psorospermum aurantiacum</i>	23.25 ± 1.77 ^b	29.70 ± 5.37 ^a	1.43 ± 0.02	152.81 ± 4.06	10.80 ± 0.00 ^b
<i>Aloe vera</i>	> 100	29.90 ± 1.13 ^a	0.34 ± 0.00	106.29 ± 3.54	> 100
<i>Sida rhombifolia</i>	> 100	> 100	0.26 ± 0.02	73.26 ± 0.66	> 100
<i>Albizia gummifera</i>	> 100	> 100	0.27 ± 0.00	126.01 ± 0.17	> 100
<i>Ficus exasperata</i>	> 100	77.30 ± 0.00 ^b	0.25 ± 0.00	73.20 ± 2.85	> 100
<i>Piper umbellatum</i>	98.30 ± 1.27 ^b	47.30 ± 3.11 ^b	0.26 ± 0.02	84.04 ± 0.95	8.15 ± 0.21 ^b
<i>Portulaca oleracea</i>	> 100	> 100	0.08 ± 0.00	48.29 ± 6.3	81.60 ± 0.57 ^b
<i>Spermaoce latifolia</i>	> 100	> 100	0.06 ± 0.00	52.14 ± 7.03	> 100
<i>Mitracarpus scaber</i>	> 100	95.00 ± 6.65	0.31 ± 0.01	99.21 ± 2.16	> 100
<i>Solanum acaleastrum</i>	> 100	> 100	0.18 ± 0.02	101.53 ± 2.33	> 100
<i>Capsicum frutescens</i>	> 100	93.30 ± 0.00 ^b	0.29 ± 0.04	89.99 ± 0.58	> 100
<i>Ascorbic acid</i>	3.40 ± 0.00 ^a	30.80 ± 0.00 ^a	1.41 ± 0.05	ND	19,50 ± 2.12 ^b

Results are represented as mean ± standard deviation, n = 3. ND: not determined because of the low inhibition percentages obtained with the highest dose of extract during the test. Data with the same letter are not significantly different while data having different letters are significantly different at p < 0.01. SC₅₀: half scavenging concentration; HO[•]: Hydroxyl radical; RPA: Reducing power ability; TAC: Total antioxidant capacity; DPPH[•]: 2, 2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl; AAE: Ascorbic acid equivalent; OD: Optical density; LP: Lipid Peroxidation.

Table 4
Tyrosinase and elastase inhibitory potential of some Cameroonian medicinal plants used traditionally for skin care.

Scientific name	% Inhibition of Tyrosinase (at 100 µg/ml)	% Inhibition of Elastase (at 100 µg/ml)
<i>Eremomastax speciosa</i>	6.73 ± 2.77	10.97 ± 0.78
<i>Acanthus montanus</i>	NA	NA
<i>Ageratum conyzoides</i>	17.02 ± 2.47	37.72 ± 0.31
<i>Aspilia africana</i>	2.299 ± 2.88	34.16 ± 0.33
<i>Dichrocephala integrifolia</i>	2.29 ± 2.91	NA
<i>Emilia coccinia</i>	26.84 ± 2.18	32.72 ± 0.59
<i>Sonchus oleraceus</i>	12.11 ± 2.61	5.79 ± 0.83
<i>Chromolena Odorata</i>	25.43 ± 2.22	22.3 ± 0.39
<i>Kalonchoe crenata</i>	33.38 ± 1.98	26.5 ± 0.65
<i>Senna alata</i>	43.43 ± 1.68	33.57 ± 0.33
<i>Commelina SP.</i>	15.85 ± 2.50	37.72 ± 0.31
<i>Bridelia micrantha</i>	11.88 ± 2.62	NA
<i>Mucuna pruriens</i>	9.31 ± 2.70	24.43 ± 0.66
<i>Phaseolus lunatus</i>	NA	NA
<i>Harungana madagascariensis</i>	NA	100 ± 0.01
<i>Psorospermum aurantiacum</i>	10.94 ± 2.65	77.58 ± 0.23
<i>Aloe vera</i>	64 ± 1.07	41.21 ± 0.30
<i>Sida rhombifolia</i>	NA	NA
<i>Albizia gummifera</i>	41.1 ± 1.75	23.49 ± 0.39
<i>Ficus exasperata</i>	20.99 ± 2.35	12 ± 0.77
<i>Piper umbellatum</i>	1.36 ± 2.93	28.82 ± 0.36
<i>Portulaca oleracea</i>	4.23 ± 5.99	34.76 ± 0.33
<i>Spermaoce latifolia</i>	3.93 ± 2.86	3.72 ± 0.85
<i>Mitracarpus scaber</i>	13.05 ± 2.59	26.45 ± 0.37
<i>Solanum acaleastrum</i>	NA	NA
<i>Capsicum frutescens</i>	3.23 ± 2.88	NA
<i>Ascorbic acid</i>	100 ± 0.01	ND
<i>Epigallocatechingallate</i>	ND	100 ± 0.01

Results are represented as mean ± standard deviation, n = 3. ND: not determined because of the low inhibition percentages obtained with the highest dose of extract during the test, NA: Not active.

sugars, saponins, sterols and leucoanthocyanins as shown in Table 5. All plant extracts revealed the presence of polyphenols. The total phenolic content ranged from 6.031 to 35.67 mg AAE/g extract. The extract of *H. madagascariensis* was found to contain 35.67 ± 0.37 AAE/g extract.

3.6. Correlations between total polyphenol content and antioxidant activity

The correlation coefficient for the selected plant extracts was found to be ranged from -1.43 to 0.995 (Table 6) in at least three out of five oxidation models used. This is indicative of negative or positive correlation between the total phenolic content and antioxidant end points studied.

3.7. Antioxidant, antityrosinase and antielastase activities of isolated fractions

The extracts of *P. aurantiacum* (PA) and *H. madagascariensis* (HM) were selected for further investigation due to their good biological activities. Fractions isolated from these extracts were tested for antioxidant, anti-tyrosinase and anti-elastase activities. The results indicate that all the fractions exhibited considerable elastase inhibitory activity (greater than 50% inhibition) as shown in Table 7. Hexane fraction of PA produced highest anti-elastase activity at 10 µg/mL compared to others plant fractions (data not shown). In order to determine the IC₅₀ value for hexane fraction we conducted experiments to assess the dose-response relationships. The IC₅₀ value for hexane fraction was 15.40 µg/mL. Fractions of HM and PA were also investigated for tyrosinase inhibition. In this assay, all the fractions were tested at a single concentration of 100 µg/mL compared to ascorbic acid (positive control). Fractions inhibited tyrosinase lower than ascorbic acid. For antioxidant activities, hexane fraction (0.350 ± 0.024) of HM at a concentration of 100 µg/mL showed greater reduction ability than ascorbic acid (0.290 ± 0.009). On the other hand, the methanolic fraction of PA exhibited the highest DPPH[•] radical scavenging activity with IC₅₀ of

Table 5

Total phenolic content and phytochemical composition of some Cameroonian medicinal plants used traditionally for skin care.

Scientific names	TPC (mg CAE/g of extract)	Phytochemicals classes of compounds							
		Polyphenols	Flavonoids	Alkaloid	Terpens	Tannins	Saponin	Sterols	Sugar
<i>Eremomastax speciosa</i>	2.16 ± 0.69	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Acanthus montanus</i>	10.38 ± 0.35	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Ageratum conyzoides</i>	17.30 ± 0.81	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>Aspilia africana</i>	16.10 ± 0.55	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Dichrocephala integrifolia</i>	10.28 ± 2.04	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Emilia coccinia</i>	23.67 ± 1.35	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	9.67 ± 0.20	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Chromolena Odorata</i>	28.29 ± 0.92	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Kalonchoe crenata</i>	14.47 ± 0.89	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Senna alata</i>	31.46 ± 0.69	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Commelina SP.</i>	10.03 ± 0.14	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Bridelia micrantha</i>	31.48 ± 1.30	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>Mucuna pruriens</i>	18.48 ± 0.23	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Phaseolus lunatus</i>	8.12 ± 0.09	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Harungana madagascariensis</i>	35.67 ± 0.37	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Psorospermum aurantiacum</i>	30.18 ± 0.95	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>Aloe vera</i>	12.35 ± 0.60	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Sida rhombifolia</i>	19.01 ± 0.58	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Albizia gummifera</i>	17.54 ± 0.06	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Ficus exasperata</i>	12.33 ± 0.12	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Piper umbellatum</i>	14.99 ± 0.09	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Portulaca oleracea</i>	7.06 ± 0.14	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Spermacoce latifolia</i>	10.44 ± 0.32	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>Mitracarpus scaber</i>	17.74 ± 0.37	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Solanum acaleastrum</i>	8.87 ± 0.00	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Capsicum frutescens</i>	17.30 ± 0.06	-	+	+	+	+	+	-	+

Results are represented as mean ± standard deviation, n = 3. TPC: Total phenolic contain; CAE: Chlorogenic acid equivalent; +: Presence of compounds; -: Absence of compounds.

Table 6The r² (correlation coefficient) values between antioxidant activities and total polyphenolic content.

Scientific name	DPPH [•] radical scavenging activity	HO [•] radical scavenging activity	Lipid Peroxidation
<i>Ageratum conyzoides</i>	0,934	ND	ND
<i>Psorospermum aurantiacum</i>	-0,41	-0,23	-1,43
<i>Ficus. Exasperata</i>	-7,22	ND	ND
<i>Chromolena odorata</i>	0,792	ND	0,994
<i>Bridelia micrantha</i>	0,61	0,981	0,929
<i>Sena alata</i>	-1,23	0,932	0,885
<i>Mitracarpus scaber</i>	0,629	ND	ND
<i>Eremomastax speciosa</i>	ND	0,754	ND
<i>Capsicum frutescens</i>	-0,66	ND	ND
<i>Mucuna pruriens</i>	-0,6	ND	ND
<i>Aspilia africana</i>	-2,14	ND	0,958
<i>Piper umbellatum</i>	-6,22	0,995	0,794
<i>Aloe vera</i>	0,857	ND	ND
<i>Portulaca eracea</i>	ND	ND	0,946
<i>Harungana madagascariensis</i> (bark)	0,964	0,043	0,335

Results are represented as mean ± standard deviation, n = 3. ND: not determined because of the low inhibition percentages obtained with the highest dose of extract during the test; HO[•]: Hydroxyl radical; DPPH[•]: 2, 2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl.

4.55 ± 0.05 µg/mL compared to ascorbic acid 7.45 ± 0.25 µg/mL. Hexane and methanol fractions of both plants were selected because of their good activities for further studies.

3.8. Effect of crude extract and fractions on cell viability

Cell viability was determined on B16F10 and NIH/3T3 cell lines using MTT assay. It was found that crude extract, hexane and methanol fractions of HM and PA were non-toxic at 12.5, 25, 50 µg/ml on NIH 3T3 cells (Fig. 1). In contrast, crude and hexane extracts of HM significantly decreased cell viability at the concentration of 100 µg/mL. It is interesting to note that after fractionation of crude extract of HM, the

hexane and methanol fractions obtained were less toxic at the concentration of 100 µg/ml, and it therefore suggested that the fractionation might contribute to eliminate some toxic substances within the crude extract. On the other hand, crude extract of PA and its hexane fraction exhibited a concentration-dependent decrease of cell viability with the highest concentration having between 50–60% of cell viability. On the contrary, the methanol fraction was found to be non-toxic at all tested concentrations as shown in Fig. 2. In addition, we found that the crude extract of HM and PA with their hexane fractions were highly toxic on B16F10 cells at 100 µg/mL with cell viability of about 30–35% (Fig. 2). Methanol fractions of HM and PA did not have any significant reduction in cell viability even at the highest concentration used.

Table 7
Antioxidant, tyrosinase and elastase inhibitory activities of plant fractions.

Medicinal plant	Fractions	DPPH [*] % Inhibition (at 100 µg/mL)	DPPH [*] radical scavenging activity SC ₅₀ (µg/mL)	RPA (Absorbance at 700 nm)	Tyrosinase % Inhibition (at 100 µg/ml)	Elastase % Inhibition (at 100 µg/ml)
<i>Harungana madagascariensis</i>	Hexane	94.82 ± 0.17	25.85 ± 0.55 [*]	0.350 ± 0.024	47.00 ± 2.12	51.50 ± 0.04
	Methylene chloride	87.28 ± 0.17	41.00 ± 0.60 [*]	0.280 ± 0.002	28.00 ± 1.6	88.73 ± 0.05
	Ethyl acetate	91.48 ± 0.1	7.55 ± 0.35 ^{ns}	0.320 ± 0.007	39.00 ± 2.61	82.79 ± 0.08
	Methanol	93.33 ± 0.35	7.65 ± 0.05 ^{ns}	0.260 ± 0.014	45.00 ± 0.5	90.5 ± 0.04
	Crude extract	95.43 ± 0.17	23.85 ± 2.35 [*]	0.305 ± 0.014	48.82 ± 1.75	91.10 ± 0.04
<i>Psorospermum aurantiacum</i>	Hexane	80.99 ± 1.75	41.55 ± 3.25 [*]	0.0.270 ± 0.002	42.00 ± 6.11	95.25 ± 0.02
	Methylene chloride	84.20 ± 5.25	25.30 ± 2.50 [*]	0.220 ± 0.002	15.00 ± 0.6	85.17 ± 0.07
	Ethyl acetate	92.84 ± 4.54	8.65 ± 0.15 ^{ns}	0.260 ± 0.037	23.00 ± 0.87	91.20 ± 0.04
	Methanol	89.64 ± 0.35	4.55 ± 0.05 ^{ns}	0.290 ± 0.009	26.5 ± 0.05	92.30 ± 0.03
	Crude extract	95.43 ± 0.17	9.80 ± 0.10 ^{ns}	0.280 ± 0.015	35.00 ± 1.74	88.61 ± 0.10
Ascorbic acid		91.85 ± 0.35	7.45 ± 0.25	0.290 ± 0.009	96.64 ± 0.97	ND
Epigallocatechin gallate		ND	ND	ND	ND	98.96 ± 0.01

Results are represented as mean ± standard deviation, n = 3. ND: not determined because of the low inhibition percentages obtained with the highest dose of extract during the test. RPA: Reducing power ability; DPPH^{*}: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; SC₅₀: Half scavenging concentration.

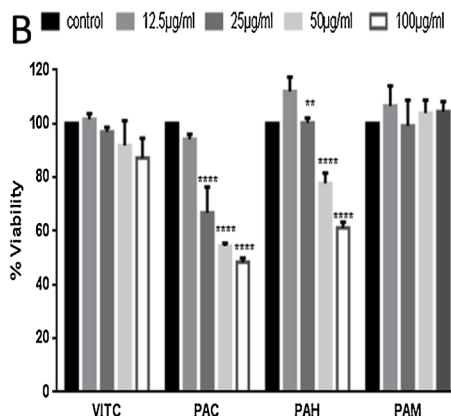
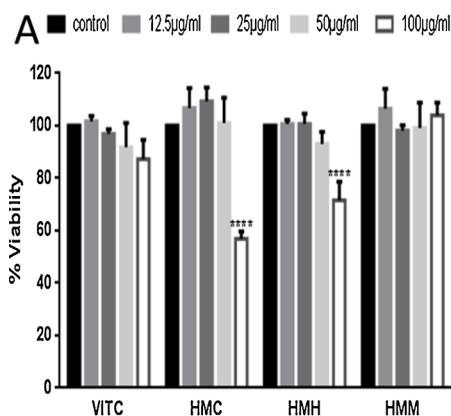


Fig. 1. Effect of crude extract and fractions on the viability of NIH3T3 cells. NIH3T3 cells were treated with various concentrations of plant extracts and then incubated for 24 h. Cell viability was determined using the MTT assay. Data shown are mean values ± S.D. (n = 3). Data are analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test: *p < 0.05 compared to the control group. HMC: H. madagascariensis crude extract; HMH: H. madagascariensis Hexane fraction; HMM: H. madagascariensis methanol fraction; PAC: P. aurantiacum crude extract; PAH: P. aurantiacum Hexane fraction; PAM: P. aurantiacum methanol fraction; VIT C: vitamin C.

3.9. Protective effect of plant extract on UVB irradiation induced intracellular oxidative stress in B16F10 and NIH/3T3 cells

Intracellular oxidative stress was qualitatively assessed in B16F10 and NIH/3T3 cells by staining cells with DCFDA. HM extract, PA extract and their fractions recorded weaker fluorescence suggesting fractions mediated decrement in intracellular oxidative stress as shown in Figs.3 and 4.

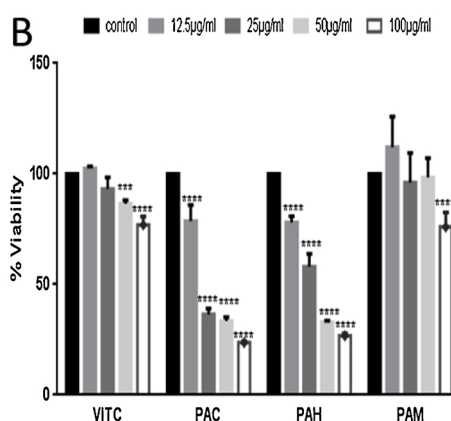
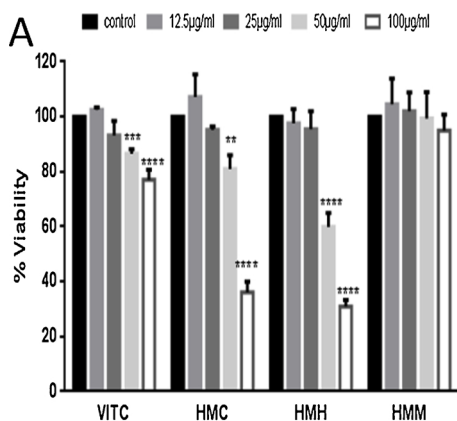


Fig. 2. Effect of crude extract and fractions on the viability of B16F10 cells. B16F10 cells were treated with various concentrations of plant extracts and then incubated for 24 h. Cell viability was determined using the MTT assay. HMC: H. madagascariensis crude extract; HMH: H. madagascariensis Hexane fraction; HMM: H. madagascariensis methanol fraction; PAC: P. aurantiacum crude extract; PAH: P. aurantiacum Hexane fraction; PAM: P. aurantiacum methanol fraction. Data shown are mean values ± S.D. (n = 3). Data are analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test: group *p < 0.05 compared to the control group; VIT C, vitamin C.

3.10. Effect of crude extract and fractions on expression of Nuclear factor Erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) and Heme oxygenase-1 (HO-1) in NIH/3T3 and B16F10 cells

In our study, HO-1 mRNA level was down regulated following UV-B treatment but Nrf-2 was not significantly up regulated as compared to control in NIH/3T3. Hexane fraction of HM accounted for HO-1 upregulation that was significantly higher than ascorbic acid treated

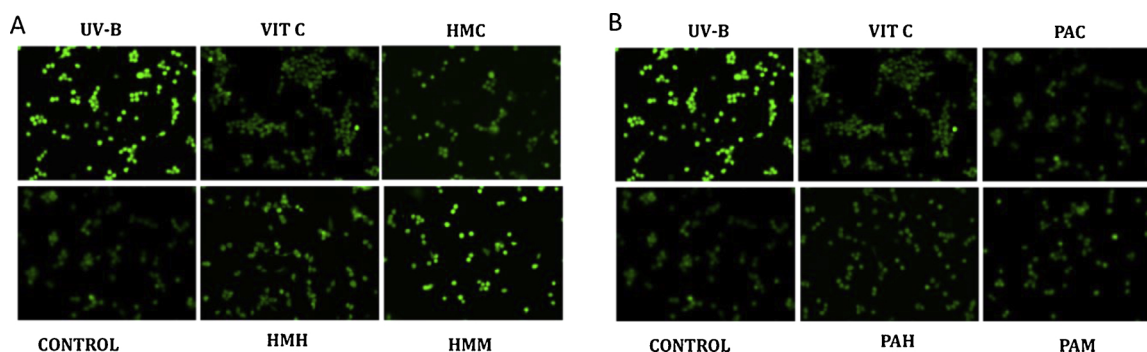


Fig. 3. Effect of plant extract on UVB-induced intracellular oxidative stress in NIH/3T3. The cells were pre-treated with different amount of selected plant extracts for 1 h, followed by UVB exposure (29.7 mJ/cm²) for 30 min. Inhibition of intracellular levels of (A, B) ROS is shown. HMC: *H. madagascariensis* crude extract; HMH: *H. madagascariensis* Hexane fraction; HMM: *H. madagascariensis* methanol fraction; PAC: *P. aurantiacum* crude extract; PAH: *P. aurantiacum* Hexane fraction; PAM: *P. aurantiacum* methanol fraction; VITC: vitamin C.

group. Similar responses were recorded following PA (crude and hexane) extracts treated groups, but methanol extract of PA failed to record upregulation of HO-1 as shown in Fig. 5. Alterations in mRNA levels of Nrf-2 indicate a confusing pattern where in the expected upregulation in ascorbic acid treated group is not recorded. But crude and hexane extracts of PA recorded significant increment in mRNA levels of Nrf-2 that were in agreement with HO-1 levels. The Nrf-2 and HO-1 levels were found to be upregulated in B16F10 following UV exposure as shown in Fig. 6. A similar trend was observed in ascorbic acid, Hexane fraction (HM and PA) and methanol fraction of PA, but methanol fraction of HM showed significant decrement in Nrf-2 and HO-1 levels.

4. Discussion

In the present study, plants with medicinal properties used by the populations of Fouban and Nkol Anga'a were investigated for their skin anti-aging potential. The data obtained during the ethnopharmacological survey revealed a sizable number (26 plants) used by the resident population for treatment of skin and related ailments. Plants belonging to Fam. Asteraceae were the most commonly used (6 species). Decoction, maceration in water or application of raw shoot were the main methods of preparing potions for traditional usage. Except for the reports on *H. madagascariensis* bark (anti-inflammatory) and *A. vera* (anti-tyrosinase) other plants lacked scientific information and hence were studied for the first time for their anti-skin aging properties [21,22]. Oxidative stress and free radicals are strongly implicated in the mechanism of skin aging and during which there is an increase in the activities of the enzymes (tyrosinase, elastase and collagenase) which

degrade the skin components [10].

The *in vitro* antioxidant activity of the plants showed their potential to protect skin-cell constituents such as lipids, DNA and proteins from oxidative damage induced by oxidative stress which may occur *in vivo* upon generation of deleterious radicals such as hydrogen peroxide, hypochlorous acid, hydroxyl radicals, nitric oxide radicals and singlet oxygen [23]. Oxidative stress is a complex process and the experimental model cannot be described by a single method [23]. It is therefore essential to use several methods to study the antioxidant activity of a plant extract [17]. In this study, this activity was evaluated *in vitro* by measuring the ability of our extracts to reduce ferric ion (Fe³⁺) and phosphomolybdc complex, scavenge DPPH[•] and HO[•] radicals and inhibit lipid peroxidation.

DPPH[•] free radical method is a sensitive way to determine the antioxidant activity of plant extracts [24]. DPPH[•] is a free radical and can accept an electron or hydrogen radical from a donor compound to become stable molecule. Hydroxyl radicals (HO[•]) formed in the biological systems have been recognized to be the most reactive species and extremely damaging [25]. Therefore, the scavenging activity of HO[•] can be considered as one of the best indicators of the antioxidant potential of a compound. All the plant extracts tested scavenged the DPPH[•] and quenched hydroxyl radicals. Although their respective actions were different, this result proved the capability of these extracts to donate an electron or hydrogen to stabilize DPPH[•] and HO[•] radicals. The variation observed between the scavenging or quenching activities of the extracts could be attributed to their unequal content in total polyphenols content shown in Table 5. Among of the extracts tested, the extract from *H. madagascariensis* exhibiting a positive correlation between its DPPH[•] and HO[•] scavenging activity and polyphenols content (Table 6) coupled

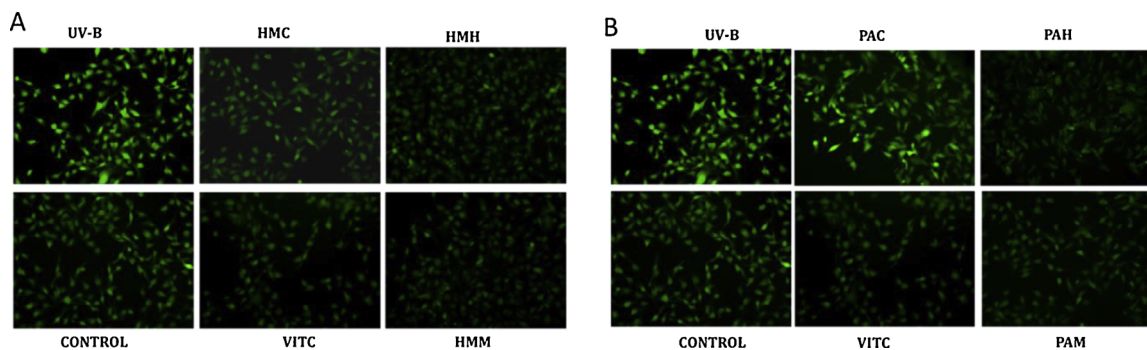


Fig. 4. Crude extracts and fractions reduce UVB-induced intracellular oxidative stress in B16F10. To test the anti-oxidant potential of plant extracts, generation of ROS was measured in a cell-free system using fluorescent probes DCFDA. The cells were pretreated with different amount of plant extracts for 2 h, followed by UVB exposure (39.6 mJ/cm²) for 30 min. Inhibition of intracellular levels of ROS (A,B) is shown. HMC: *H. madagascariensis* crude extract; HMM: *H. madagascariensis* Hexane fraction; HMM: *H. madagascariensis* methanol fraction; PAC: *P. aurantiacum* crude extract; PAH: *P. aurantiacum* Hexane fraction; PAM: *P. aurantiacum* methanol fraction; VIT C: vitamin C.

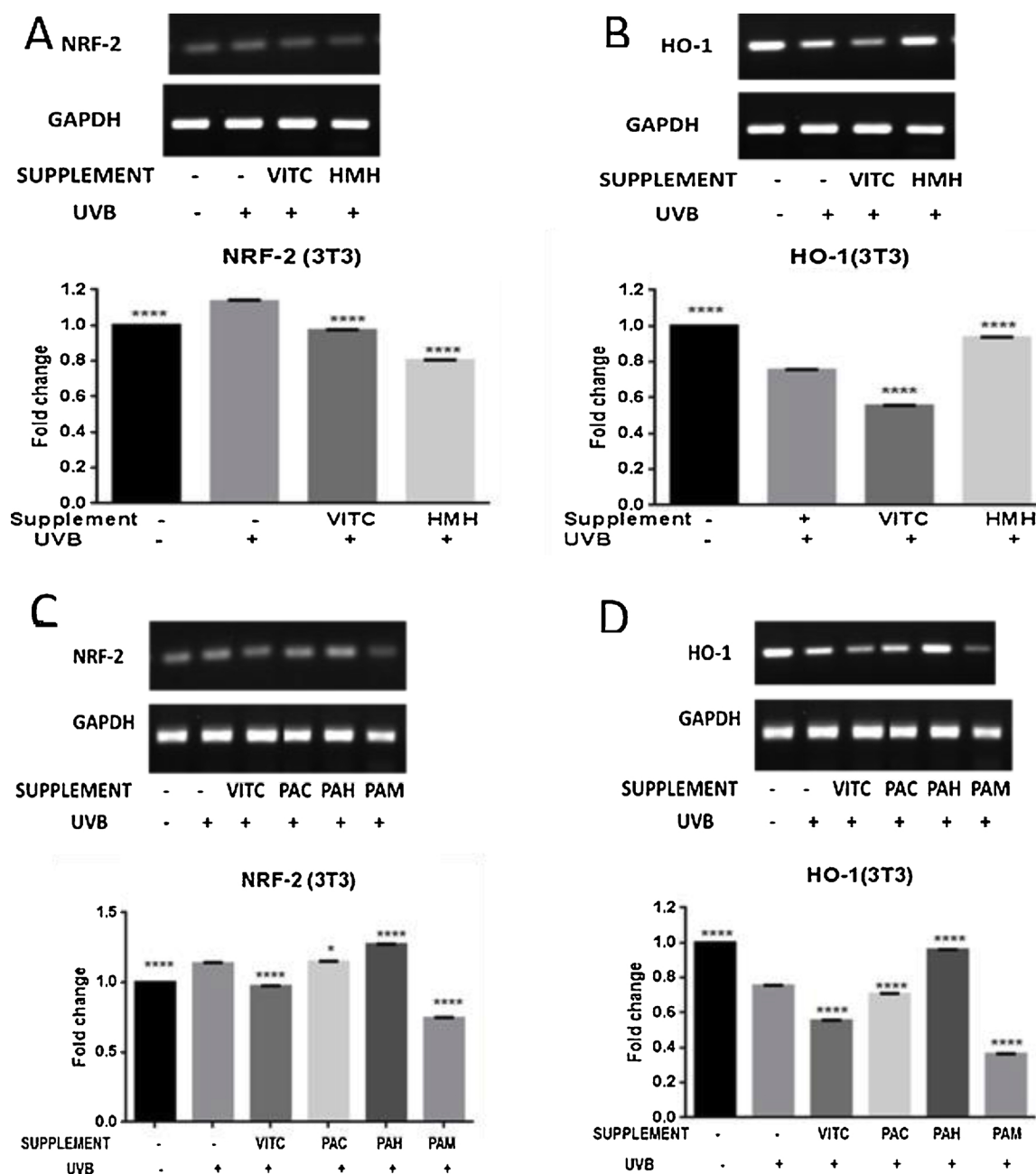


Fig. 5. Effect of crude extract and fractions on expression of Nuclear factor Erythroid 2-related factor -2 (Nrf-2) and Heme oxygenase-1 (HO-1) in NIH/3T3 cells. Cells were pre-treated with various amounts of plant, HMH and VITC (A,B) then PAC, PAH,PAM (C,D) for 2 h followed by UVB exposure (29.7 mJ/cm²) and incubated for further 24 h. The mRNA levels of NRF-2 and HO-1 were then determined by reverse transcription-polymerase chain reaction and quantified by image J software. GAPDH mRNA was used as internal control. Data shown are mean values ± S.D. (n = 3). Data are analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett’s test: *p < 0.05 compared to UVB-exposed group. Nrf-2, Nuclear factor Erythroid 2-related factor 2; HO-1: Heme oxygenase-1; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HMH: *H. madagascariensis* Hexane fraction; PAC: *P. aurantiacum* crude extract; PAH: *P. aurantiacum* Hexane fraction; PAM: *P. aurantiacum* methanol fraction; VITC: vitamin C.

to its lower SC₅₀ values presented in Table 3, was identified as the highest antiradical. Lipid peroxidation is also involved in skin aging since epidermis layer is rich in polyunsaturated fatty acids [26]. The formation of HO° radical by the Fenton reaction in iron-rich tissues contributes to the initiation of lipid peroxidation [27]. Extracts of plants under study were tested for their lipid peroxidation inhibitory activity and have been found to inhibit the phenomenon. Extracts from *H. madagascariensis* and *P. aurantiacum* exhibited higher activity. This observation suggests these plant extracts are able to scavenge hydroxyl radical or chelate iron. This inhibitory activity may be due to phytochemical compounds other than polyphenols. In fact, there is a lower or

no correlation (Table 6) between this activity and the total polyphenol content. The reducing power of the compounds could serve as a significant indicator of the antioxidant potential [28]. So, to evaluate this property of the plant extracts, we measured their ability to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺. The respective extract of *H. madagascariensis*, and *P. aurantiacum* showed the highest reducing capacity as shown by their respective optical density = 1.48 and 1.43 which remained higher than the standard optical density = 1.41 (Table 3). The extract of *H. madagascariensis* showed the highest antioxidant capacity.

Elastin is the main component of the elastic fibers and is a part of extracellular matrix protein that provides elasticity to the connective

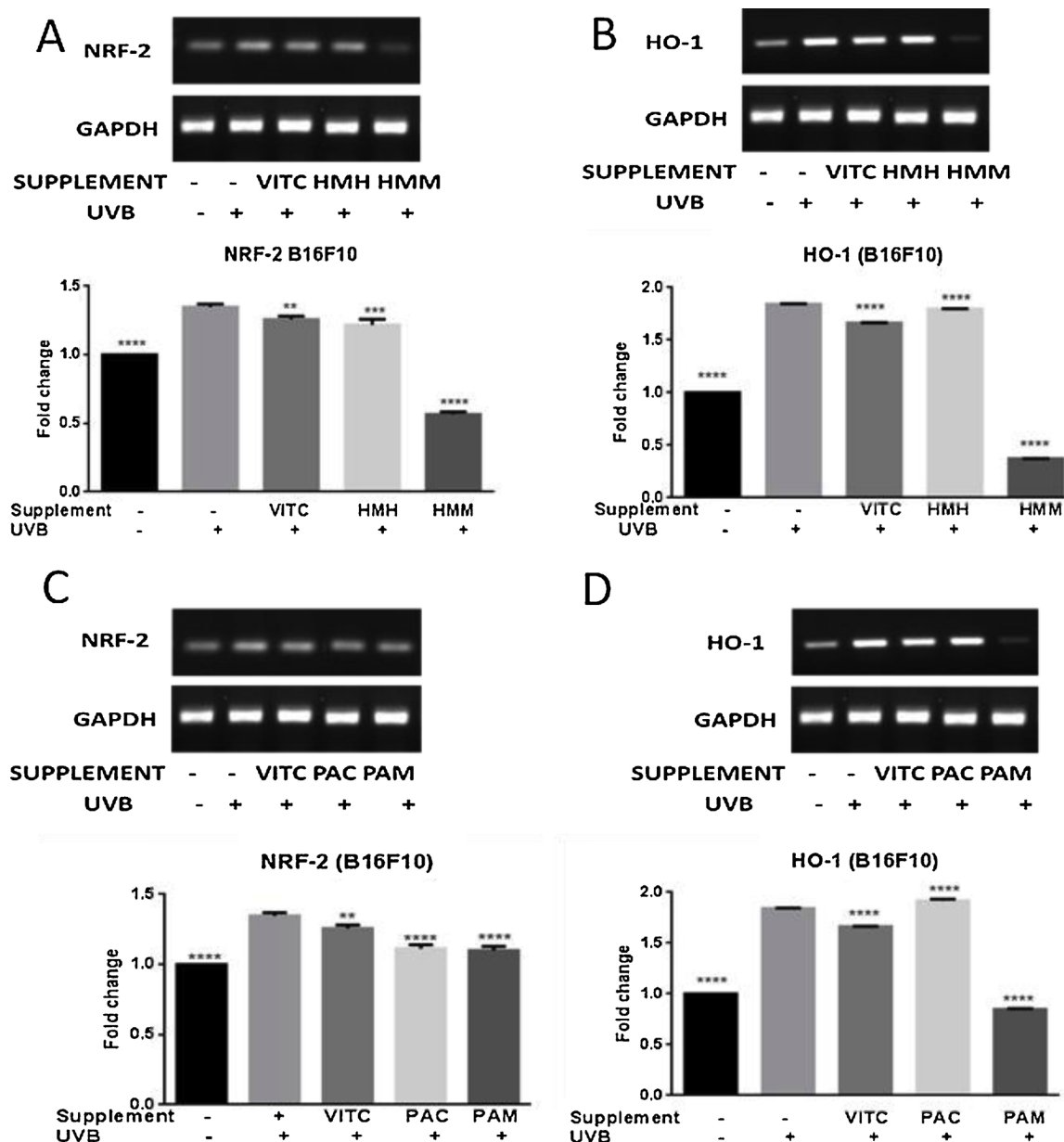


Fig. 6. Effect of crude extract and fractions on expression of Nuclear factor Erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) and Heme oxygenase-1 (HO-1) in B16F10 cells. Cells were pre-treated with various amounts of plant, HMM: HMM and VITC (A,B) then PAC, PAH, PAM (C,D) for 2 h followed by UVB exposure (39.6 mJ/cm²) and incubated for further 24 h. The mRNA levels of NRF-2 and HO-1 were then determined by reverse transcription-polymerase chain reaction and quantified by image J software. GAPDH mRNA was used as internal control. Data shown are mean values ± S.D. (n = 3), Data are analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test: *p < 0.05 compared to UVB-exposed group. Nrf-2: Nuclear factor Erythroid 2-related factor 2; (HO-1) 1: Heme oxygenase-1; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HMM: H. madagascariensis Hexane fraction; HMM: H. madagascariensis methanol fraction; PAC: P. aurantiacum crude extract; PAH: P. aurantiacum Hexane fraction; PAM: P. aurantiacum methanol fraction; VITC: vitamin C.

tissues. Elastase is the proteinase enzyme able to attack all major connective tissue matrix proteins, including elastin, collagen, proteoglycans, and keratins, and this leads to the decreased of skin elasticity and triggers several diseases in the body such as chronic inflammatory diseases, rheumatoid and lung disease [10]. Similarly, tyrosinase is an enzyme which catalyzes two rate-limiting steps in melanin synthesis; however, an activation of tyrosinase caused by exposure to UV light or ROS (reactive oxygen species) leads to uncontrolled melanogenesis and pigmentation disorders. Thus, inhibition of these enzymes is important to prevent all these disorders [8] The extracts were tested for their inhibitory effect on elastase and tyrosinase. From all the extracts surveyed, extract of *H. madagascariensis*, and *P. aurantiacum* were found to strongly inhibit both enzymes as testified by their higher inhibition

percentages (Table 4). Triterpenoids and flavonoids were evidenced (Table 4) in the extracts. Since these phytoconstituents are recognized to be inhibitors of elastase and tyrosinase inhibitory activities [16,29] it may be suggested these phytochemicals contribute in part to the enzymes inhibitory action of these extracts.

In this study, an extract was considered to have good anti-aging potential if it inhibited both enzymes and exhibited high activity in all the five oxidative models tested. Therefore, based on EC₅₀/IC₅₀ values, quantity of ascorbic acid equivalent/g extract values and absorbance as presented in Table 3, inhibition percentage of elastase and tyrosinase activities (Table 4), crude extract of *P. aurantiacum* and *H. madagascariensis* were considered to be most antioxidative and inhibitors of elastase and tyrosinase. These extracts were fractionated and fractions

tested for antioxidant activities, elastase and tyrosinase inhibitory activities. Hexane and methanolic fractions of both plants showed higher antioxidant and enzymes inhibitory activities (Table 7) and were selected for further studies.

Ultraviolet radiations are one of the prime causes of skin ailments including an increased risk of skin cancer [20]. Oxidative stress and cytotoxicity is routinely induced *in vitro* by treating cultured cells with UV-B [4]. To further study the antioxidant activity of the both plant extracts and fractions, we assessed their ability to protect skin mouse cells lines from UVB-induced oxidative stress. The 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) stain is commonly used to assess intracellular oxidative stress depicted in the form of prominent fluorescence [30]. It was observed that UV-B treated cells showed prominent fluorescence whereas cells treated with tested extracts or ascorbic acid showed varying levels of decreased fluorescence. These results provide evidence that the extracts are able to efficiently protect skin cells from UV-B induced oxidative stress.

Depletion of intracellular antioxidants is one of the key reasons of cell damage and mortality while its prevention by exogenous treatment is an effective strategy in variety of somatic cells including fibroblast and melanoma. Nuclear factor Erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) and Heme oxygenase (HO-1) have been identified as key players that protect depletion of intracellular glutathione by a prompt response following an experimentally induced cellular damage [31]. The results showed that hexane fractions of HM and PA modulated the mRNA levels of these genes suggesting these fractions as well as the crude extract of PA having potent antioxidant capacity that are involved in the protection of skin cells against UV-B.

A drawback of the study is that only methylene chloride-methanol (1: 1 v / v) extract was used to screening the efficacy of the plant extracts. In fact, it was shown in a study that the phytochemicals present in the plant extract were present in different concentrations in different solvents [32]. Hence, it is possible that more potent forms of phytochemicals present in the plants tested may have been obtained in different solvents used during the extraction process.

5. Conclusion

Use of medicinal plants for treating skin ailments were surveyed in local populations but, only few traditional healers provided detailed information. A total of twenty six medicinal plants could be surveyed belonging to sixteen families with maximum representation from Family of Asteraceae. The extracts of *H. madagascariensis* and *P. aurantiacum* were non-toxic at lower levels and exhibited strong antioxidant, anti-elastase and anti-tyrosinase activities. Hexane fractions from these extracts showed varying degrees of upregulation of mRNA levels in intracellular antioxidant genes and prevented melanoma and fibroblast cells lines from UVB- induced intracellular oxidative stress. These results provide compelling evidence on skin anti-aging potential of *H. madagascariensis* and *P. aurantiacum* and warrants detailed *in vivo* studies in relevant experimental models. It is therefore useful for further studies to characterize compounds present in these extracts that are responsible of these properties.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest

Author contributions

FNN, RVD and PMF defined the research subject and its aims, conceived and designed the experiments. JNM, AJ and KU performed the experiments. JNM, KS, RDV, FNN and PMF analyzed the data and wrote the paper. All the authors read and approved the final version of this manuscript

Acknowledgements

We are grateful to the traditional healers for volunteering and sharing the information about their rich heritage and the Cameroon National Herbarium for identification of plants. Authors are thankful to The Maharaja Sayajirao University of Baroda, India for technical support.

Funding

Part of this work was carried out at The Maharaja Sayajirao University of Baroda, India, when Mrs. Jacqueline Njikam Manjia was a visiting scientist, under the CV Raman International Fellowship for African Researchers.

References

- [1] C. Mathen, R. Thergaonkar, M. Teredesai, G. Soman, S. Peter, Evaluation of anti-elastase and antioxidant activity in antiaging formulations containing terminalia extracts, *Int. J. Herb. Med.* (2014) 95–99.
- [2] R. Negi, D. Pande, A. Kumar, R.S. Khanna, H.D. Khanna, Evaluation of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in the cord blood of preterm low birth weight neonates, *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 25 (2012) 1338–1341, <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.633672>.
- [3] M. Ben-Yehuda Greenwald, S. Ben-Sasson, H. Bianco-Peled, R. Kohen, Skin redox balance maintenance: the need for an Nrf2-Activator delivery system, *Cosmetics*. 3 (2016) 1, <https://doi.org/10.3390/cosmetics3010001>.
- [4] K. Bravo, L. Duque, F. Ferreres, D.A. Moreno, E. Osorio, Passiflora tarminiana fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts, *J. Photochem. Photobiol. B* 168 (2017) 78–88, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.01.023>.
- [5] H. Swallow, J. Latimer, R.M. Haywood, M.A. Birch-Machin, Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 626–634, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.019>.
- [6] J.-H. Koo, H.T. Kim, H.-Y. Yoon, K.-B. Kwon, I.-W. Choi, S.H. Jung, H.-U. Kim, B.-H. Park, J.-W. Park, Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells, *Exp. Mol. Med.* 40 (2008) 313, <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.3.313>.
- [7] C. Wiegand, C. Raschke, P. Elsner, Skin aging: a brief summary of characteristic changes, in: M.A. Farage, K.W. Miller, H.I. Maibach (Eds.), *Textb. Aging Skin*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2017, pp. 55–65, https://doi.org/10.1007/978-3-662-47398-6_5.
- [8] T. Kim, H.J. Kim, S.K. Cho, W.Y. Kang, H. Baek, H.Y. Jeon, B. Kim, D. Kim, Nelumbo nucifera extracts as whitening and anti-wrinkle cosmetic agent, *Korean J. Chem. Eng.* 28 (2011) 424–427, <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0357-6>.
- [9] T.S. Thring, P. Hili, D.P. Naughton, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants, *BMC Complement. Altern. Med.* 9 (2009), <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-27>.
- [10] Hulya Celik Onar, Elastase, tyrosinase and lipoxigenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. Leaves, *J. Med. Plants Res.* 6 (2012), <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1127>.
- [11] S. Jadoon, S. Karim, M.H.H.B. Asad, M.R. Akram, A. Kalsoom Khan, A. Malik, C. Chen, G. Murtaza, Anti-aging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longevity, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015 (2015) 1–17, <https://doi.org/10.1155/2015/709628>.
- [12] Y.-C. Hsueh, C.-W. Chou, K.J. Senthil Kumar, K.-T. Fu, H.-M. Wang, L.-S. Hsu, Y.-H. Kuo, C.-R. Wu, S.-C. Chen, H.-L. Yang, Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the up-regulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 1245–1255, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.020>.
- [13] G. Zengin, Y.S. Cakmak, G.O. Guler, A. Aktumsek, In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2638–2641, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.033>.
- [14] X.-Y. Su, Z.-Y. Wang, J.-R. Liu, In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds, *Food Chem.* 117 (2009) 681–686, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.076>.
- [15] K.K. Lee, J.-D. Choi, The effects of *Areca catechu* L extract on anti-aging, *Int. J. Cosmet. Sci.* 21 (1999) 285–295, <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.1999.196563.x>.
- [16] A. Manosroi, P. Jantrawut, T. Akihisa, W. Manosroi, J. Manosroi, *In vitro* anti-aging activities of *Terminalia chebula* gall extract, *Pharm. Biol.* 48 (2010) 469–481, <https://doi.org/10.3109/13880200903586286>.
- [17] B. Blažeković, S. Vladimir-Knežević, A. Brantner, M. Štefan, Evaluation of Antioxidant Potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. "Budrovka": A Comparative Study with *L. angustifolia* Mill, *Molecules* 15 (2010) 5971–5987, <https://doi.org/10.3390/molecules15095971>.
- [18] J.B. Harborne, *Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Chapman and Hall, London ; New York, 1980.
- [19] O. Odebiyi, E. Sofowora, Antimicrobial alkaloids from a Nigerian chewing stick

- (fagara zanthoxyloides), *Planta Med.* 36 (1979) 204–207, <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097271>.
- [20] M.A.A. Mohamed, M. Jung, S.M. Lee, T.H. Lee, J. Kim, Protective effect of *Disporum sessile* D.Don extract against UVB-induced photoaging via suppressing MMP-1 expression and collagen degradation in human skin cells, *J. Photochem. Photobiol. B* 133 (2014) 73–79, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.03.002>.
- [21] E.O. Iwalewa, V. Naidoo, V. Bagla, J.N. Eloff, Nitric Oxide Producing Effect of Six Extracts From *Harungana Madagascariensis* Lam, ex Poirlet (Guttiferae) stem bark, 2009, pp. 14–21.
- [22] P.K. Mukherjee, N. Maity, N.K. Nema, B.K. Sarkar, Bioactive compounds from natural resources against skin aging, *Phytomedicine*. 19 (2011) 64–73, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.003>.
- [23] L. Fu, B.-T. Xu, R.-Y. Gan, Y. Zhang, X.-R. Xu, E.-Q. Xia, H.-B. Li, Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2112–2124, <https://doi.org/10.3390/ijms12042112>.
- [24] P.S. Kumar, S. Sucheta, V. Sudarshana Deepa, P. Selvamani, S. Latha, Antioxidant activity in some selected Indian medicinal plants, *Afr. J. Biotechnol.* 7 (2008) 1826–1828, <https://doi.org/10.5897/AJB2008.000-5030>.
- [25] M. Maizura, A. Aminah, W.M. Wan Aida, Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract, *Int. Food Res. J.* 18 (2011) 529–534.
- [26] T.-K. Lin, L. Zhong, J. Santiago, Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2017) 70, <https://doi.org/10.3390/ijms19010070>.
- [27] P. Costa, S. Gonçalves, P.B. Andrade, P. Valentão, A. Romano, Inhibitory effect of *Lavandula viridis* on Fe²⁺-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties, *Food Chem.* 126 (2011) 1779–1786, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.085>.
- [28] A.S. Rao, S.G. Reddy, P.P. Babu, A.R. Reddy, The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran, *BMC Complement, Altern. Med.* 10 (2010), <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-4>.
- [29] N. Sultana, N.H. Lee, Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*, *Phytother. Res.* 21 (2007) 1171–1176, <https://doi.org/10.1002/ptr.2230>.
- [30] R.R. Sonani, R.P. Rastogi, N.K. Singh, J. Thadani, P.J. Patel, J. Kumar, A.K. Tiwari, R.V. Devkar, D. Madamwar, Phycoerythrin averts intracellular ROS generation and physiological functional decline in eukaryotes under oxidative stress, *Protoplasma*. 254 (2017) 849–862, <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0996-5>.
- [31] R.N. Jadeja, N.H. Urrunaga, S. Dash, S. Khurana, N.K. Saxena, Withaferin-a reduces acetaminophen-induced liver injury in mice, *Biochem. Pharmacol.* 97 (2015) 122–132, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.024>.
- [32] S.C. Ugochukwu, I. Arukwe Uche, Onuoha Ifeanyi, Preliminary phytochemical screening of different solvent extracts of stem bark and roots of *Dennetia tripetala* G, *Baker* 3 (2013) 10–13.