

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 08 Mai 1945 – Guelma –

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie**



Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire

=====

Etude de l'activité antioxydante et antihémolytique de la propolis : Approche théorique

=====

Présenté par :

BOUZIDI Selma

GOUAMI Meroua

HADDOUCHE Maissa

Devant le jury composé de :

Présidente : Noudjoud GRARA

Professeur

Examinatrice : Nadia Hanane BOUSSENANE

Maitre Conférence Classe B

Encadrant : Asma BRAIK SERIDI

Maitre Conférence Classe B

Septembre 2020

Remerciements

Nous tenons avant tout à remercier Dieux tout puissant, qui nous adonné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous adressons nos remerciements à M^{me} Noudjoud GRARA, Professeur à l'université de Guelma, d'avoir présidé le jury et à M^{me} Nadia Hanane BOUSSENANE, Maitre de Conférence à l'université de Guelma, d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Il nous est particulièrement agréable, d'exprimer notre gratitude et notre reconnaissance à M^{me} SERIDI BRAIK ASMA, pour son encadrement, sa disponibilité tout au long de ce travail, ses critiques judicieuses, son attention particulière et son soutien moral.

Nous remercions toute personne ayant contribué de prêt ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Louange à Dieu, grâce auquel les bonnes œuvres sont faites, Louange à Dieu qui m'a aidé à terminer mon parcours académique avec succès et que je conclus aujourd'hui avec ce travail que je dédie :

À vous chère maman, je vous suis très reconnaissante pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma vie et pas seulement dans mes études, je prie Dieu de vous offrir une longue vie et une bonne santé.

À vous mon cher père, ces lignes de cette dédicace ne sauraient suffire à exprimer mon respect, ma gratitude et ma fierté envers vous, ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, mon avenir et ma formation. Que Dieu Tout-Puissant vous accorde une longue vie et une bonne santé.

À vous mon cher frère, merci d'être à mes côtés tout au long de ma vie, je demande à Dieu de te rendre heureux et de t'aider dans ta vie.

À vous, mon enseignante M^{me} Braik, merci de m'avoir soutenu tout au long de ce travail, merci pour votre confiance en mes capacités et votre fierté.

À ma grand-mère Aldjeia, à mes oncles Rafik et Adlan, merci pour votre amour et votre soutien pour moi.

À mon cousin Lamis, Amira, Doaa et Hiba, à mes amis proches Khadija, Souad et Feryal, à mes collègues Meroua et Maissa.

SELMA

Dédicace

Avec l'aide de Dieu tout puissant, qui a tracé le

Chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à :

*La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère Nacira
qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et
soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*Mon cher père Bachir qui m'a appris le sens De la persévérance tout au long de mes
études, pour Son sacrifice, ses conseils et ses encouragements.*

À mon cher mari Isshak

Mon bébé Baraa

Mes chères sœurs : kamila ,dorsaf ,Meriem

A mes amis

Meroua

Dédicace

Avant tout, je remercie mon Dieu le tout puissant, créateur Allah, Grand et Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de m'avoir permis de finaliser ce travail dans des meilleures conditions.

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail ;

À mes chers parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.

À mon cher frère Lazhar à qui je souhaite un avenir plein de réussite.

À mes chères tantes Hiba, Mounira, et Hassina que dieu les protège .

À mon oncle Yazid Haddouche.

À mon cher mari Toufik,

À toute ma famille.

À mon enseignante Mme Braik Asma.

À ma chère copine Naidja Khaoula

À Mes camarade de parcours Gouami Marwa et Bouzidi Selma.

À tous Mes amis.

À tout qui me connaisse de près ou de loin.

Maissa

Résumé

La propolis est un produit résineux de la ruche d'abeilles collecté par les abeilles à partir de bourgeons des plantes et des écorces des arbres. La propolis est très utilisée pour ses propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne. Les études scientifiques ne cessent de démontrer toutes ses vertus thérapeutiques contre des maladies où le stress oxydant est un facteur déclenchant ou une conséquence de ces états pathologiques. Ce mémoire présente une approche théorique sur l'activité antioxydante et antihémolytique de la propolis. 227 articles ont été consultés sur PubMed, interface gratuite de la base de données en sciences biomédicales MEDLINE. La lecture critique a révélé que 50% de ces articles décrivent des études *in vitro* de l'activité antihémolytique et que les études utilisant le modèle *in vivo* pour tester cette activité représente 15 %. La propolis montre une bonne activité antioxydante grâce à sa composition polyphénolique. Ce qui lui permet d'assurer un effet contre l'hémolyse oxydative grâce au piégeage des radicaux libres initiateurs de la peroxydation lipidique de la membrane érythrocytaire. L'effet antihémolytique de la propolis peut également être dû à l'interruption de la peroxydation lipidique par l'insertion des flavonoïdes dans la membrane cellulaire des érythrocytes.

Mots clés : Activité antioxydante ;Activité antihémolytique ; Propolis ; Polyphénols, Flavonoïdes

Abstract

Propolis is a resinous bee hive product collected by bees from plant buds and tree bark. Propolis is widely used for its antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties. Scientific studies continue to demonstrate all its therapeutic virtues against diseases where oxidative stress is a trigger or a consequence of these pathological states. This work presents a theoretical approach on the antioxidant and antihemolytic activity of propolis. 227 articles were consulted on PubMed, the free interface of the MEDLINE biomedical sciences database. Critical reading revealed that 50% of these articles describe *in vitro* studies of antihemolytic activity and that studies using the *in vivo* model to test for this activity represent 15%. Propolis shows good antioxidant activity due to its polyphenolic composition. This allows it to provide a positive effect against oxidative hemolysis by trapping free radicals initiating lipid peroxidation of the erythrocyte membrane. The antihemolytic effect of propolis may also be due to the interruption of lipid peroxidation by the insertion of flavonoids into the cell membrane of erythrocytes.

Keywords: Antioxidant activity; Antihemolytic activity; Propolis; Polyphenols, Flavonoids

ملخص

البروبوليس او العكبر هو منتج من خلايا النحل الذي يجمع من براعم النباتات ولحاء الأشجار. يستخدم البروبوليس على نطاق واسع لخصائصه المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات والميكروبات. تستمر الدراسات العلمية في إثبات جميع مزاياها العلاجية ضد الأمراض التي يكون فيها الإجهاد التأكسدي سبباً أو نتيجة لهذه الحالات المرضية. يقدم هذا العمل نهجاً نظرياً حول نشاط البروبوليس المضاد للأكسدة والمضاد للتحلل الدموي. تمت استشارة 227 مقالاً في PubMed وهي الواجهة المجانية لقاعدة البيانات MEDLINE للعلوم الطبية الحيوية. أظهرت القراءة النقدية أن 50% من هذه المقالات تصف الدراسات المخبرية *in vitro* لنشاط المضاد للتحلل الدموي وأن الدراسات التي تستخدم النموذج *in vivo* لاختبار هذا النشاط تمثل 15%. يُظهر البروبوليس نشاطاً جيداً كمضاد للأكسدة بفضل تركيبته المتكونة من البوليفينولات. هذا يسمح لها بتوفير تأثير ضد انحلال الدم التأكسدي عن طريق محاصرة الجذور الحرة التي تبدأ أكسدة الدهون المكونة لغشاء كرات الدم الحمراء. قد يكون تأثير البروبوليس المضاد للتحلل الدموي أيضاً بسبب انقطاع أكسدة الدهون عن طريق دخول مركبات الفلافونويد في غشاء خلية كريات الدم الحمراء.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للأكسدة؛ نشاط مضاد للتحلل الدموي؛ البروبوليس؛ البوليفينول؛ الفلافونويد

Liste des figures

Figure 1: Aspect de la propolis	3
Figure 2: Processus de formation et cibles des ERO.....	8
Figure 3: Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone	10
Figure 4: Représentation des groupements piègeurs des flavonoïdes, exemple de la quercétine	13
Figure 5: Section de la membrane érythrocytaire avec un accent sur la composition des protéines membranaires intégrales incorporées dans une bicouche phospholipidique	15
Figure 6: Représentation schématique de la composition des protéines membranaires intégrales incorporées dans une bicouche phospholipidique	16
Figure 7: schéma d'hémolyse intratissulaire	20
Figure 8: Schéma d'hémolyse intravasculaire. - SRE : système réticulo-endothélial appelé actuellement système des phagocytes mononuclés	21
Figure 9: Hyperhémolyse extravasculaire	22
Figure 10: Classification des anémies hémolytiques.....	23
Figure 11: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	Error! Bookmark not defined.
Figure 12: représentation graphique de la chronologie d'apparition des articles étudiant l'activité antihémolytique par année de publication	39
Figure 13: Représentation de la répartition des différents types d'études effectués sur l'activité antihémolytique.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1: Structure des flavonoïdes	11
Tableau 2: exemples de plantes médicinales douées d'activité antihémolytique.....	29

Liste des abréviations

AG : Acide gallique

AC : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AE : Echangeur anionique

AG : Acides gras

AH : Anémie hémolytique

AHI : Anémies hémolytiques d'origine immunologique

AIHA : Anémie hémolytique auto-immune

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

APH : Acétylphénylhydrazine

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine-Triphosphate

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

Ca: Calcium

CAPE : Ester phényléthylique d'acide caféique

CAT : Catalase

CO₂ : Dioxyde de carbone

CPZ : Chlorpromazine

Cu²⁺:Ions de cuivre

DO : Densité optique

DPPH: 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl

E. Coli: *Escherichia coli*

EDTA : acide éthylène-diamine-tétra-acétique

EEP-M : Extrait éthanolique de *Melipona quadrifasciata anthidioides*

EEP-S : Extrait éthanolique de *Scaptotrigonadepilis*

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FA : Acide flufénamique

Fe : Fer

G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GLUT1 : Transporteur de glucose 1

GPI : Glycosyl-phosphatidyl-inositol

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Globules rouges

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Hb : Hémoglobine

HClO : Acide hypochloreux

HgCl₂ : Chlorure mercurique

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

HPN : Hémoglobinurie paroxystique nocturne

HT50 : le temps correspondant à 50% de l'hémolyse maximale

IgG : Immunoglobulines de type G

IgM : Immunoglobulines M

IL-6 : Interleukine 6

IL-8 : Interleukine 8

K : Potassium

LDH : Lactate déshydrogénase

Mb : Membrane

MEDLINE: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online

Mg : Magnésium

Mn : Manganèse

Na : Sodium

Na CO₃ : Carbonate de sodium

Na₂HPO₄ : Phosphate dissodique

NaCl : Chlorure de sodium

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NaH₂PO₄ : Phosphate monosodique

O₂ : Oxygène

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS : Tampon phosphate salin

PIG-A : Phosphatidylinositol glycan class A

PK : Pyruvate kinase

PPT : polyphénols totaux

R[•] : Radical libre

RH : Radicalperoxylipidique

RhAG : *Rh-associatedglycoprotein*

RPE : Extrait de *Reichardiapicroide*

SOD : superoxyde dismutase

TNF- α : Tumor Necrosis Facto α

TRAIL : *Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing*

V B₁₂ : Vitamine B₁₂

Zn : Zinc

α -TO[•] : Radical α -tocophéryl

2,3-DPG : Acide 2,3-bisphosphoglycérique

3-HF : 3-Hydroxyflavone

Les unités couramment utilisées sont citées ci- dessous :

μ m : Micromètre

C° : Température en degrés Celsius

g : Gramme

h : Heure

kg : kilogramme

mg : Milligramme

ml: Millilitre

mn : Minute

nm : Nanomètre

V : Volume

Sommaire

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre I : Propolis et Antioxydants naturels

1. La propolis.....	2
1.1 Définition et origine.....	2
1.2 Historique.....	2
1.3 Description de la propolis	2
1.4 Composition de la propolis	3
1.5 Utilisation de la propolis.....	4
1.6 Propriétés pharmacologiques	4
2. Antioxydants naturels.....	8
2.1 Oxydants et antioxydants.....	8
2.2 Antioxydants phénoliques.....	9
2.3 Mécanisme d'action antioxydante des polyphénols	12
2.4 Toxicité des antioxydants	13

Chapitre II : Globule rouge et processus hémolytique

1. Globules rouges	14
1.1 Structure des globules rouges	14
1.2 Fonction des globules rouges.....	14
1.3 Structure de la membrane érythrocytaire.....	14

1.4	Echanges membranaire des globules rouges	16
1.5	Mécanisme physiologique du maintien de l'intégrité de la membrane érythrocytaire	17
1.6	Facteurs influençant la fluidité membranaire	18
2.	Hémolyse	18
2.1	Définition et types d'hémolyse.....	18
2.2	Physiopathologie de l'hémolyse.....	19
2.3	Types de maladies hémolytiques	22
3.	Anti-hémolytiques	27
3.1	Définition	27
3.2	Action des anti-hémolytiques synthétiques	28
3.3	Action des antihémolytiques naturels (polyphénoliques).....	28

Chapitre III : Méthodes d'étude in vitro de l'hémolyse

1.	Préparation de la suspension érythrocytaire	33
2.	Test de l'innocuité de la substance à tester vis-à-vis des érythrocytes.....	33
3.	Activité antihémolytique de la substance à tester contre l'hémolyse induite par H ₂ O ₂ ..	34
4.	Activité antihémolytique de la substance à tester contre l'hémolyse induite par le stress osmotique	35
5.	Activité antihémolytique de la substance à tester contre l'hémolyse induite par le stress thermique.....	36
	Discussion	38
	Conclusion	48
	Références	49

Introduction

Introduction

Malgré l'amélioration remarquable des conditions de vie durant ces dernières décennies, l'anémie demeure un problème majeur de santé publique. Elle a été classée par l'OMS comme l'un des dix problèmes les plus sérieux du monde moderne (*Zinebi et al. 2017*). L'anémie hémolytique est caractérisée par la destruction prématurée des globules rouges (hyper-hémolyse) (*Lecouffe et al. 2019*). Elle peut être aiguë ou chronique et peut mettre la vie en danger (*Van Rhee, 2019*).

Par ailleurs, le stress oxydatif est défini comme une perturbation de l'équilibre redox des cellules en faveur des oxydants, ce déséquilibre entraînant des dommages oxydatifs sur les composants cellulaires (*Powers et al. 2010*) telle que les altérations au niveau des protéines, des cassures sur l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique (*Djoudi et Ghebrioua 2017*). Le stress oxydant est impliqué dans la pathogénèse de plusieurs maladies comme conséquence ou cause. En effet, le stress oxydant peut être la cause de l'anémie dite oxydative.

La thérapeutique antihémolytique médicamenteuse fait appel à divers molécules synthétiques, présentent le plus souvent des effets secondaires (*Sakhri, Mennecier et Quoix, 2013*).

Environ 125 médicaments ont été impliqués comme cause d'anémie hémolytique immunitaire (*Garratty, 2010*). De ce fait, la recherche de substances naturelles ayant des effets antihémolytiques est devenue nécessaire.

Le regain d'intérêt en thérapeutique pour les molécules bioactives issues des végétaux, est en rapport avec le fait que celles-ci présentent des effets secondaires limités, ces biomolécules possèdent de nombreuses activités biologiques attribuées aux métabolites secondaires comme les polyphénols (*Aberrane et Mehalla 2019*).

La propolis est un produit résineux naturel à haute valeur médicinale, historique et économique (*Freires, Alencar et Rosalen, 2016*), résultant de la collecte de résine provenant de différentes parties de plantes, telles que des bourgeons de feuilles, de branches, de fleurs et de pollen, avec l'ajout de sécrétions mandibulaires d'abeilles. La propolis est un mélange complexe présentant une grande diversité chimique. La richesse des espèces végétales est responsable de la présence d'une grande variété des substances dans la propolis, telles que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les terpènes (*Bonamigo, Campos, Oliveira, et al. 2017a*).

Bien que sa composition soit variable, la propolis est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle, car elle présente de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques telles que des activités antioxydante (*Kalthoff et Strassburg 2019*), antibactérienne(*Przybylek et Karpinski, 2019*), immunomodulatrice (*Ivanovska et al. 1995*), antivirale (*Amoros et al. 1992*) et anticancéreuse (*Sawicka et al. 2012*).

L'objectif de notre approche est d'effectuer une lecture critique et une synthèse bibliographique des études portant sur l'activité antioxydante et antihémolytique de la propolis tout en exposant un protocole expérimental pour tester l'effet antioxydant et antihémolytique de la propolis *in vitro*.

Chapitre I

Propolis et Antioxydants naturels

1 La propolis

1.1 Définition et origine

Comme le miel, le venin, le pollen ou la gelée royale, la propolis est un produit de la ruche d'abeilles. C'est un matériau résineux collecté par les abeilles à partir de bourgeons de peuplier, de pin, de bouleau, de noix, érable et substances lipophiles sécrétée par des plaies végétales ou des résines. Ces substances, d'origine végétale, sont mélangées à des enzymes présentes dans la salive des abeilles (A-glycosidase) et à des matériaux accessoires introduits pendant la production (pollen ou cire) donnant naissance à la propolis (Pasupuleti et al. 2017; Mărghitaș, Dezmirean et Bobiș 2013).

Le mot grec *propolis* révèle son utilisation par les abeilles dans la ruche, *pro* : pour ou en défense et *polis* : la ville, ce qui signifie « défense de la ruche » (Bonamigoet al. 2017).

1.2 Historique

De nombreux enregistrements montrent que la propolis a été utilisée par les anciens Égyptiens, Perses et Romains. En 460–377 avant JC, Hippocrate favorisé l'utilisation de la propolis pour soigner les plaies externes et internes et ulcères. Au XVIIe siècle, la propolis a été utilisée comme ingrédient majeur des onguents de guérison.

Le développement de la recherche sur la propolis est strictement lié au développement de la chimie et de la composition chimique de la propolis qui a été déterminée aux XIXe et XXe siècles. Cependant, il est seulement au cours des cinquante dernières années que les scientifiques ont prouvé que la propolis est une substance médicale active et importante dans plusieurs domaines médicaux (Oryan, Alemzadeh, et Moshiri 2018).

1.3 Description de la propolis

La propolis est une matière résineuse que les abeilles (*Apis mellifera* L.) collectent sur les arbres et les plantes. Les matériaux mise à la disposition des abeilles pour la fabrication de propolis sont produits par une variété de processus botaniques dans différentes parties des plantes. Les matériaux collectés sont partiellement digérés par l'abeille ajouté à la cire d'abeille pour former le produit final (propolis crue ou propolis *innatura*). Cette propolis crue est dure et semblable à de la cire lorsqu'elle est froide, mais douce et très collante lorsqu'elle est chaude. Le matériau a une odeur aromatique agréable (de Groot 2013).

Il existe plusieurs types de propolis qui sont fonction de l'écosystème de l'abeille. On peut trouver des propolis de couleur jaune ambre jusqu'au brun foncé en passant par des variétés qualifiées de vertes ou de rouges(*Cardinault et al. 2012*).



Figure 1:Aspect de la propolis

1.4 Composition de la propolis

La propolis est le troisième composant le plus important des produits apicoles. Sa composition est fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents sur cette zone géographique, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce de l'abeille(*Cardinault et al. 2012*).

La propolis est composée principalement de résine (50%), de cire (30%), d'huiles essentielles (10%), de pollen (5%) et d'autres composés organiques (5%). Les composés phénoliques, les esters, les flavonoïdes, les terpènes, les bêta-stéroïdes, les aldéhydes aromatiques et les alcools sont les principaux composés organiques présents dans la propolis. Douze flavonoïdes différents, à savoir la pinocembrine, l'acacétine, la chrysin, la rutine, la lutéoline, le kaempférol, l'apigénine, la myricétine, la catéchine, la naringénine, la galangine et la quercétine; deux acides phénoliques, l'acide caféique et l'acide cinnamique; et un dérivé de stilbène appelé resvératrol. La propolis contient également des vitamines importantes, telles que les vitamines B1, B2, B6, C et E et des minéraux utiles tels que le magnésium (Mg), le calcium (Ca), le potassium (K), le sodium (Na), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le fer (Fe). Quelques enzymes, telles que la déshydrogénase succinique, la glucose-6-phosphatase, l'adénosine

triphosphatase et la phosphatase acide, sont également présentes dans la propolis (*Pasupuleti et al. 2017*).

1.5 Utilisation de la propolis

1.5.1 Utilisation par l'abeille

Les abeilles utilisent la propolis principalement comme scellant et désinfectant. En effet, elle est utilisée pour sceller les trous et les fissures, lisser la surface intérieure et maintenir la température interne de la ruche ainsi que pour prévenir les intempéries et l'invasion des prédateurs. En raison de son activité antimicrobienne, la propolis contribue également à un environnement interne aseptique et est utilisée pour momifier le corps des intrus afin d'éviter leur putréfaction à l'intérieur de la ruche (*Kocot et al. 2018*).

1.5.2 Utilisation par l'homme

La propolis brute est lavée à l'eau, solubilisée dans l'éthanol à 95%, et filtrée à plusieurs reprises pour éliminer la cire et les débris organiques afin de créer le baume de propolis ou la teinture de propolis possédant des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales et peut avoir un large éventail d'autres activités biologiques bénéfiques (*Bankova et al. 1992*).

1.5.3 Utilisation commerciale

Les produits de la propolis sont commercialisés sous diverses formes telles que : les crèmes, onguents, comprimés, gélules, ampoules, sirops, sprays (pour les cavités buccales et nasales) et des pastilles. Elle peut être trouvée dans les cosmétiques, y compris les shampooings, revitalisants, onguents, lotions, rouges à lèvres, dentifrices et vernis à ongles. La propolis peut également être utilisée comme additif alimentaire pour conserver et pour aromatiser en même temps. D'autres applications incluent son utilisation comme adhésif, pour sceller les fissures, pour protéger les surfaces en bois, comme vernis pour violons et autres instruments (*de Groot 2013*).

1.6 Propriétés pharmacologiques

La propolis a suscité l'intérêt des chercheurs au cours des dernières décennies en raison de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Malgré des différences de

composition entre les propolis, un certain nombre de propriétés pharmacologiques et/ou d'effets santé commun font consensus (*Sforcin 2007*).

1.6.1 Activité antioxydante

La propolis est une substance constituée de nombreux composés antioxydants (vitamines E et C et polyphénols). Les études ont montré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec son contenu en polyphénols. De ce fait, la propolis de peupliers plus riche en polyphénols possède un potentiel antioxydant supérieur à celui de la propolis verte du Brésil par exemple (*Kumazawa et al. 2004*).

In vivo, la propolis réduit significativement la peroxydation lipidique au niveau de différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) et module l'expression des enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) (*Sobočanec et al. 2006 ; Okutan et al. 2005*).

1.6.2 Activité anti-inflammatoire

Sur des modèles *in vivo* d'arthrite, d'œdème de la patte ou d'inflammation chronique et aiguë, la propolis exerce un effet anti-inflammatoire significatif. Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés : inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire (IL-6) et inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxydase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase). Le CAPE s'est révélé être le plus puissant modulateur du métabolisme de l'acide arachidonique à la base de la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines pro-inflammatoires (*Ramos et Miranda 2007 ; Rossi et al. 2002*).

1.6.3 Activité antibactérienne

L'activité bactéricide de la propolis et/ou de ses constituants est la plus largement documentée. Cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram+ et Gram- (de type anaérobie et aérobie) mais avec une plus grande efficacité sur les souches Gram+. Les différentes études suggèrent que la propolis et ses composés pourraient inhiber la croissance bactérienne par blocage de la division cellulaire, par une désorganisation du cytoplasme, par une inhibition de la synthèse protéique ou par une inhibition du processus d'adhésion. Certaines études ont montré que des souches résistantes, voire multirésistantes aux antibiotiques, étaient sensibles à la propolis. Il a également été montré que la propolis,

lorsqu'elle est prise en association avec certains antibiotiques, augmente leur efficacité (streptomycine, ampicilline, gentamycine)(*Lu et al. 2003*).

1.6.4 Activité antifongique et antivirale

La propolis exerce une activité fongicide contre les germes appartenant au genre *Candida*, mais aussi contre les champignons de type *Aspergillus* et *Microsporum* (*Özcan 2004*) ainsi que contre les levures (*Dalben-Dota et al. 2010*).

Les études ont montré que la propolis et/ou ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : myxovirus, poliovirus, coronavirus, rotavirus, adénovirus. La propolis de peupliers et l'un de ses principaux composés, l'ester phényléthylique d'acide caféique (CAPE), ont un potentiel anti-VIH (comme agent anti-intégrase du virus) et un effet additif avec l'AZT (inhibiteur de la transcriptase reverse) (*Kujumgiev et al. 1999*).

1.6.5 Activité immunomodulatrice

La propolis possède une action immuno- modulatrice *in vitro* et *in vivo* sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise. Elle stimule le pouvoir de présentation des macrophages, l'activité lytique des macrophages et des naturel killer contre les cellules tumorales. Elle augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (*Sforcin 2007*).

Il a également été montré que la propolis exerçait une activité antiallergique. La prise de propolis réduit les éternuements et irritations dans le cas de rhinite allergique par inhibition de la libération d'histamine (*Shinmei et al. 2009*).

1.6.6 Activité antitumorale

Les résultats de nombreuses études montrent un effet antiprolifératif vis-à-vis d'un très grand nombre de lignées tumorales (sang, peau, côlon, sein, prostate, poumon, foie, cerveau, rein). Dans la grande majorité des cas, l'effet antiprolifératif résulte d'une restauration du signal d'apoptose. Les différentes molécules de la propolis vont pouvoir agir à différents endroits pour induire l'apoptose soit par la voie intrinsèque, via la libération du cytochrome C mitochondrial, soit par la voie extrinsèque, via l'induction de ligands TRAIL, de protéines pro-apoptotiques (bax, bak), des caspases, des protéines p21 et p53 et l'inhibition des protéines antiapoptotiques (Bcl-2, Bc-xl). L'effet antiprolifératif

peut également, selon les lignées considérées, résulter d'un arrêt du cycle cellulaire par inhibition des cyclines ou par blocage des récepteurs hormonaux (*Chen et al. 2007*).

2 Antioxydants naturels

2.1 Oxydants et antioxydants

L'oxydation est générée par des radicaux libres dits également espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces espèces chimiques neutres ou chargées instables qui ne cherchent qu'à récupérer un électron dans leur environnement pour retrouver un état plus stable. Ces deux propriétés font que les réactions d'oxydation sont très rapides et se propagent en cascade (figure 2) (Rolland 2004).

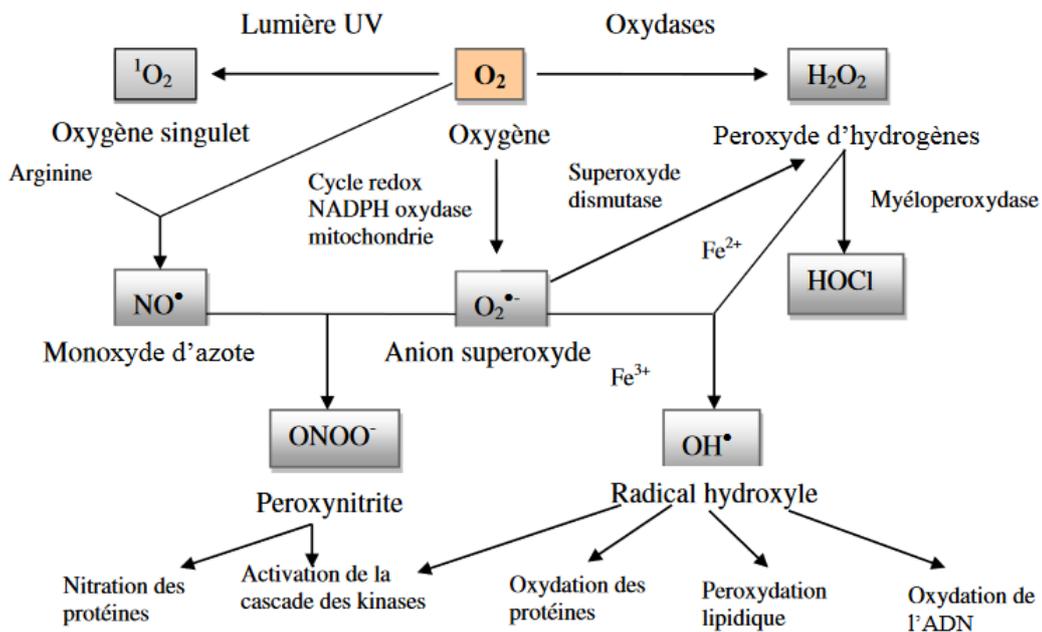


Figure 2:Processus de formation et cibles des ERO(Achat 2013).

Par ailleurs, un antioxydant peut être défini comme une substance (petite molécule ou système complexe) qui, lorsqu'elle est ajoutée à une molécule oxydable en petites quantités, est capable de protéger ces molécules en retardant ou en inhibant leur auto-oxydation (où le substrat protégé est généralement une bio-macromolécule, comme les lipides, les protéines ou l'ADN)(Avan et al. 2016).

Afin d'éviter un état de stress oxydant, la production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydases (GPx), couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone, ...) et de

protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation d'ERO(*Pincemail et al. 2002*).

2.2 Antioxydants phénoliques

2.2.1 Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes et les coumarines.

2.2.1.1 Les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. On en distingue deux principales classes ; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents(*Muanda 2010*).

2.2.1.2 Les stilbènes

Ils se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, parmi ces composés, on trouve le resvératrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales.

2.2.1.3 Les lignanes et les lignines

Les monolignols sont les dérivés de l'acide cinnamique, ils servent de précurseurs pour les composés de types phénylpropanoïdes tels que les lignanes et les lignines.

2.2.1.4 Les coumarines

Ils sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Du point de vue structural, ils sont classés en coumarines simples, avec des substituants sur le cycle du benzène, les coumarines substituées en position 3 et/ou 4(*Muanda 2010*).

2.2.1.5 Les tannins

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux, les tannins hydrolysables qui sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose ; et les tannins condensés qui sont des composés phénoliques hétérogènes. Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavones, flavan-3-ols, 5 desoxy-3-flavonols et flavan-3,4-diols (*Fethoun et Saheb 2015*).

2.2.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments hydrosolubles responsables de la couleur des végétaux. Il en existe plus de 6000 variétés regroupées en 6 classes principales. Ils ont des propriétés antioxydantes supérieures à celles des vitamines (*Erlund 2004*).

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (Figure 3) (*Di Carlo et al. 1999*).

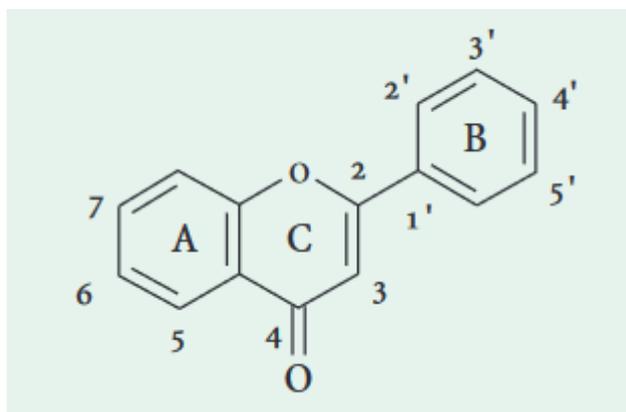


Figure 3: Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone (*Di Carlo et al., 1999*).

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes.

Selon la nature de l'hétérocycle (γ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue les flavones et les flavonols, les flavanones, les flavanols et les dihydroflavanols (Tableau 1). Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques). Flavones et flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la

quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine. Les flavanones (naringénine) et les flavanols (catéchine) ainsi que les dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte (Ghedira 2005).

Tableau 1: Structure des flavonoïdes (Kumar et Pandey 2013).

Groupe de flavonoïde	Structure de base	Exemples		
Flavones				
Flavanols				
Flavanones				
Flavanonol				
Isoflavones				
Flavan-3-ols				

2.3 Mécanisme d'action antioxydante des polyphénols

La particularité structurale donne à la fonction phénol un caractère plus acide que les autres groupements alcools : elle perd facilement un proton H^+ pour former l'ion phénoxy. La perte d'un hydrogène (proton et électron) engendre la formation d'un radical fortement stable. C'est cette réactivité chimique qui confère aux composés phénoliques leur caractère antioxydant (*Bellebcir 2008*).

Les principaux mécanismes de l'activité antioxydante des polyphénols sont :

- Le piégeage direct des EOR ;
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène ;
- La protection des systèmes de défense antioxydants (*Achat 2013*).

2.3.1. Inhibition enzymatique

Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro* particulièrement dans le cas des flavonoïdes : inhibition d'une grande variété d'enzymes, modulation du fonctionnement de divers récepteurs ainsi que du processus de transcription de certains gènes (par interaction dans le cytosol avec les facteurs de transcription ou certains précurseurs) (*Havsteen 2002*). L'inhibition de la production des EOR par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR. Cette double action est bien illustrée par le cas de la xanthine oxydase, cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (*Hanasaki, Ogawa, et Fukui 1994*).

2.3.2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ou du cuivre entrent dans la composition des hémoprotéines et sont considérés comme cofacteurs d'enzymes antioxydantes. Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton :



Divers polyphénols sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques empêchant ainsi la formation des ERO (figure 19) (*Hider, Liu, et Khodr 2001*).

2.3.3. Piégeage des radicaux libres

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres: radicaux hydroxyles (OH^\bullet), anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante)(*Ghedira 2005*):



Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à la présence du cycle B dihydroxylé (Figure 4 en jaune) pouvant céder des électrons aux radicaux libres. On note aussi la présence de la liaison insaturée entre C2 et C3 (en rouge) ainsi que la fonction 4-oxo- sur le cycle C (en vert) et autre groupements fonctionnels (en bleu) capables de chélater les ions métalliques (Cu, Fe) qui peuvent renforcer les effets délétères des radicaux libres (*Williams, Spencer, et Rice-Evans 2004*).

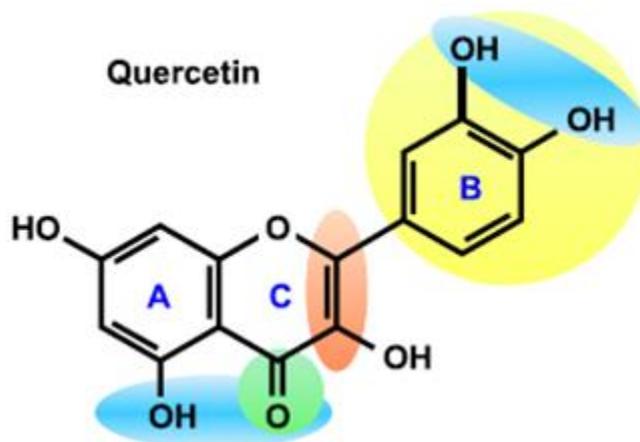


Figure4: Représentation des groupements piégeurs des flavonoïdes, exemple de la quercétine(*Williams, Spencer, et Rice-Evans 2004*).

2.4 Toxicité des antioxydants

Les antioxydants sont des molécules en général faiblement toxiques. Pourtant, pour certains d'entre eux, leur utilisation à forte dose n'est pas dénuée de danger. Par exemple, le radical α -tocophéryl ($\alpha\text{-TO}^\bullet$) stabilisé par mésomérie, peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono et poly-insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique. Ce rôle

prooxydant de l' α -tocophérol en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -tocophéryl est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération (*Pastre et Priymenko 2007*).

Par ailleurs, les flavonoïdes sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes mais ils sont susceptibles d'avoir un effet prooxydant. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène. L'activité pro-oxydante de ces substances est le résultat de leur capacité à réduire les métaux comme le Fe^{+3} pour donner Fe^{+2} lequel réagira avec O_2 ou H_2O_2 avec génération d'initiateurs de l'oxydation. En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*. Cependant, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes (*Kebieche 2009*).

Chapitre II

Globule rouge et Processus hémolytique

1 Globules rouges

1.1 Structure des globules rouges

Les globules rouges (GR), ou érythrocytes, sont des composantes cellulaires les plus abondantes dans le sang et ont été largement caractérisés depuis leur observation initiale à la fin des années 1600. Ils constituent la majorité des cellules sanguines, représentant 35 à 45% du volume de sang (*Whelihan et Mann 2013*).

Les GRs, sont des disques biconcaves avec un diamètre moyen de $8\mu\text{m}$ et un volume moyen de 90 fl. Ils sont critiques pour l'échange gazeux. Leur produit principal est l'hémoglobine (Hb) (le vecteur d' O_2 et CO_2 à travers le corps). C'est l'Hb qui produit la rougeur caractéristique associée aux érythrocytes. La forme biconcave des GRs, associés à la flexibilité de la membrane (Mb) cellulaire, permettent aux cellules de se dilater jusqu'à 150 fl ou d'entrer dans des capillaires d'un diamètre considérablement inférieur à $8\mu\text{m}$ (*Peter Klinken 2002*). La durée de séjour des GRs dans le sang est de 120 jours en moyenne et le temps de transit médullaire des érythroblastes est de 5/6 jours. À mesure que les GRs vieillissent, leurs membranes deviennent rigides et inflexibles, ils sont ensuite retirés de la circulation par les macrophages (*Valensi 2005*).

1.2 Fonction des globules rouges

La fonction principale associée aux érythrocytes est le transport d'oxygène des capillaires pulmonaires aux tissus capillaires, où il est échangé contre dioxyde de carbone (*Peter Klinken 2002*). Ils jouent également un rôle dans l'homéostasie en protégeant contre les dommages oxydatifs et en régulant la distribution du flux sanguin dans le muscle squelettique.

D'autres fonctions potentielles ont également été attribuées aux érythrocytes. Ils peuvent jouer un rôle dans la modulation de la prolifération et de la survie des lymphocytes T en améliorant la sécrétion de cytokines et l'induction de l'IL2R, modulant ainsi les ratios $\text{CD4}^+/\text{8}^+$ (*Morera et MacKenzie 2011*).

1.3 Structure de la membrane érythrocytaire

Dans les GRs, le cytosquelette et la Mb plasmique sont extrêmement et étroitement liés pour créer une structure complexe appelée squelette membranaire. Ce qui est essentiel

pour la forme et la déformabilité réversible du GR. Grâce au maintien de l'intégrité structurale de la membrane. Les GR peuvent se déformer avec une extension linéaire jusqu'à environ 250%, alors qu'une augmentation de 3 à 4% de la surface entraîne la lyse de la cellule (*Pretini et al. 2019*).

La Mb plasmique des GR est composé d'une bicouche lipidique avec des protéines transmembranaires qui forment des complexes multi-protéiques. La bicouche elle-même se compose de proportions égales de cholestérol et les phospholipides. Pour l'intégrité structurale, la bicouche se lie au squelette de la Mb à travers deux macroprotéines complexes: le complexe ankyrine et le complexe jonctionnel (également connu sous le nom de complexe 4.1R) (Figure 5).

Le squelette de GR est une protéine maillage dont les composants les plus importants sont la spectrine, actine, protéines associées à l'actine, protéine 4.1R et ankyrine. Le squelette de la Mb est constitué de tétramères de spectrine qui se lient à de courts filaments d'actine qui forment à leur tour un arrangement pseudo-hexagonal avec six spectrines triangulaires liant un filament d'actine. Chaque arrangement a trois complexes de jonction et trois complexes d'ankyrine qui facilitent le lien du cytosquelette membranaire avec le complexe d'ankyrine peut relier l'ankyrine à la β -spectrine sur un côté et la bande 3 et RhAG dans la membrane érythrocytaire, sur l'autre côté. Le complexe de jonction relie les protéines membranaires GPC et GPD, XK, Rh et Duffy sur le cytosquelette actine-spectrine par interaction avec la protéine 4.1R (*Pretini et al. 2019*).

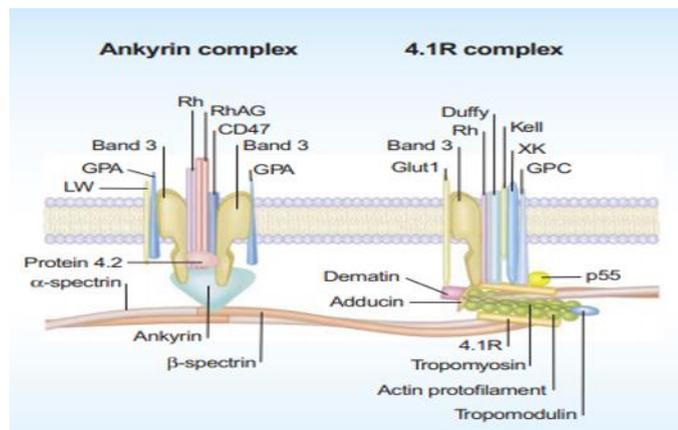


Figure 5: Section de la membrane érythrocytaire avec un accent sur la composition des protéines membranaires intégrales incorporées dans une bicouche phospholipidique (*Mohandas et Gallagher 2008*).

Il existe plus de 50 types de protéines transmembranaires noyées dans la bicouche lipidique impliquée dans le transport, adhérence et intégrité structurale. Le transport transmembranaire est exécuté par plusieurs protéines telles que la bande 3, aquaporine-1, transporteur de glucose 1 (GLUT1), protéine antigène Kidd, RhAG et divers transporteurs ioniques, en fonction de la cargaison. Les protéines impliquées dans l'adhésion ou les interactions cellule-cellule incluent ICAM-4 et Lu (Figure 6) (Pretini et al. 2019).

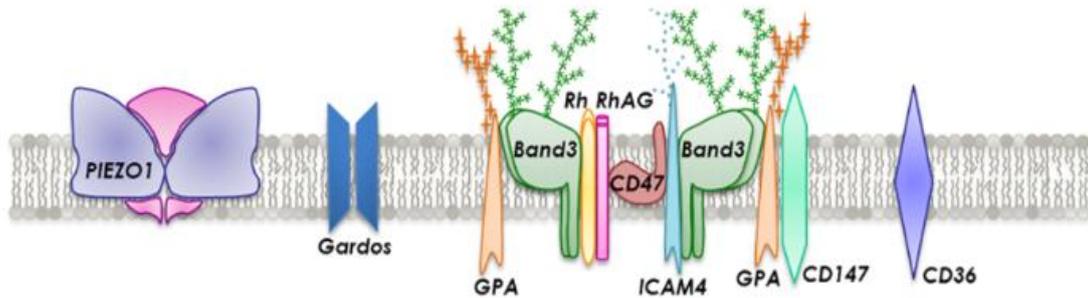


Figure 6: Représentation schématique de la composition des protéines membranaires intégrales incorporées dans une bicouche phospholipidique (Pretini et al. 2019).

1.4 Echanges membranaire des globules rouges

L'échangeur anionique $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (ou AE pour *anion exchanger*) encore appelé bande 3 dans les GRs, est la principale protéine membranaire dans les globules rouges fait partie de la famille des AE1. Elle catalyse l'échange électroneutre d'un ion chlorure et d'un ion bicarbonate de part et d'autre de la Mb plasmique. Son abondance dans la Mb érythrocytaire permet une diffusion très rapide des ions bicarbonates à travers la Mb cellulaire. Ce phénomène contribue à la respiration en augmentant considérablement la capacité sanguine de transport du CO_2 qui, diffusant dans les GR, est hydraté et transformé en ions bicarbonate rapidement expulsés contre des chlorures.

Par ailleurs, cette protéine joue un rôle structural important dans les érythrocytes en se fixant à diverses protéines du cytosquelette, elle intervient aussi dans le métabolisme érythrocytaire en interagissant avec l'enzyme glucose-6-phospho-déshydrogénase et joue également un rôle de signal de reconnaissance grâce aux motifs antigéniques qu'elle expose à la surface érythrocytaire (Guizouarn et al. 2006).

1.5 Mécanisme physiologique du maintien de l'intégrité de la membrane érythrocytaire

L'intégrité de la Mb est indispensable au bon fonctionnement de la cellule. Ceci est particulièrement vrai pour le GR dont la fonction est le transport gazeux. Des poumons jusqu'aux tissus utilisateurs, la Mb devra se défendre contre les oxydations, permettre à l'oxygène de diffuser, à la cellule de se déformer pour progresser dans les capillaires (*Portier et al. 2007*).

Les Mbs plasmatiques demeurent des structures fluides (les molécules ont si peu d'adhérence entre elles qu'elles glissent les unes sur les autres) et la maintenance de la fluidité est un pré-requis pour la fonction, la viabilité, la croissance et la reproduction des cellules (*Portier et al. 2007*).

La composition chimique des lipides membranaires peut changer soit par translocation, soit en échange avec le milieu extérieur. En général, ces changements prennent quelques minutes à quelques heures, donc des modifications de la fluidité lipidique plus rapides ne doivent pas être rapportées à des modifications de la composition chimique des membranes. Les modificateurs de la composition chimique des lipides membranaires sont :

- ***Lecholestérol*** qui est le principal rigidifiant des Mbs en condition physiologique. Il augmente la microviscosité et le degré d'ordre. Il s'associe de préférence à certains phospholipides tels que la sphingomyéline ;

- ***Le degré d'insaturation des acides gras (AGs)*** qui constituent les phospholipides membranaires. L'introduction d'une double liaison dans la chaîne d'un AG abaisse son point de fusion et induit une augmentation de volume qui s'exprime par la réduction de la viscosité et donc par une augmentation de la fluidité, ceci d'autant plus si le phospholipide était entièrement saturé au départ.

- ***La nature des phospholipides membranaires*** : la lécithine et la sphingomyéline constituent plus de 50 % du contenu lipidique des membranes et des fluides, mais leurs propriétés physiques différentes. La sphingomyéline contribue à la rigidification, tandis que la lécithine participe à la fluidification. Le ratio lécithine/sphingomyéline est un facteur majeur qui contribue à la modification de la fluidité Mb dans certaines pathologies et vieillissement des tissus. La phosphatidyléthanolamine : sa méthylation augmente la fluidité membranaire.

- **Les protéines** : elles occupent un volume comparable à celui de 50 à 100 phospholipides, elles ont donc un effet de rigidification similaire à celui du cholestérol (rigidification et augmentation de l'ordre)(*Portier et al. 2007*).

1.6 Facteurs influençant la fluidité membranaire

1.6.1 Facteurs physiques

Les facteurs physiques ont des effets très rapides (quasi-instantanés sur la Mb). En effet, des changements importants de température corporelle (baisse de 10° C) peuvent diminuer la fluidité. Les couches lipidiques de la Mb sont plus compressibles que les protéines, c'est pourquoi la pression exerce aussi un rôle sur la fluidité. La formation d'un potentiel électrique à travers la bicouche membranaire peut être à l'origine d'une petite diminution de la fluidité(*Portier et al. 2007*).

1.6.2 Facteurs physiologiques

Certains facteurs physiologiques tels que le cycle cellulaire, la différenciation et la maturation cellulaire, la densité cellulaire, le vieillissement affectent la fluidité membranaire.

Les radicaux libres sont dotés de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où ils sont produits, avec toute une série de substrats biologiques dont les lipides membranaires. Les RL peuvent modifier les propriétés chimiques et physiques des Mbs cellulaires des érythrocytes en modifiant la composition, la protection et la distribution de leurs lipides. Ceci aboutit à une altération structurale de la Mb cellulaire ce qui se manifeste par une réduction de sa fluidité qui peut modifier l'activité des protéines membranaires (*Portier et al. 2007*).

2 Hémyolyse

2.1 Définition et types d'hémolyse

L'hémolyse vient des mots grecs : *haema* : sang et *lyse* : perturbation(*Beris et Picard 2015*).C'est un terme médical qui décrit la destruction des GR par des mécanismes de lyse de leurs membranes(*Anastasiou, Chalandon, et Anchisi 2018*).

L'hémolyse est un phénomène physiologique irréversible correspond à la mort des hématies après une durée de vie moyenne de 120 jours, la perte physiologique quotidienne (1/120ème de la masse globulaire totale) a lieu principalement dans la moelle osseuse, le foie et la rate. Elle est compensée par la production d'une quantité identique d'érythrocytes par la moelle osseuse(Loustau *et al.* 2011).

Ce phénomène est pathologique lorsque cette destruction survient après une durée de vie raccourcie(Burnat *et al.* 1998), entraînant alors une libération excessive des constituants érythrocytaires dans le plasma en particulier l'Hb, ce qui leur confère une coloration plus ou moins rougeâtre après une centrifugation(Mezzou *et al.* 2006), on parle alors d'hyperhémolyse. Si l'hyperhémolyse est plus importante que la compensation médullaire, apparaît alors le syndrome d'anémie hémolytique (AH) définie par une Hb inférieure à 130 g/L chez l'homme, et inférieure à 120 g/L chez la femme(Burnat *et al.* 1998).

2.2 Physiopathologie de l'hémolyse

2.2.1 Hémolyse physiologique

L'hémolyse physiologique est un phénomène essentiellement intra-tissulaire, et une faible partie (10 à 20%) est intravasculaire(Figure 7)(Meftah 2016).

Les hématies âgées appauvries en enzymes, peu déformables, sont ralenties et bloquées dans les sinusoides où l'hypoxie et la baisse du pH aggravent leur altération. Elles sont alors phagocytées principalement par les macrophages de la moelle osseuse, mais aussi par ceux du foie et de la rate.

La molécule d'Hb est catabolisée. L'hème est séparé de la globine ; la globine subit une protéolyse tandis que l'hème sous l'action d'une hème oxydase voit son cycle tétrapyrollique ouvert avec libération de fer et de biliverdine. Le fer est oxydé en fer ferrique, stocké dans la ferritine et réutilisé dans la synthèse de l'hème par les érythroblastes. La biliverdine est transformée en bilirubine par une biliverdine réductase. La bilirubine passe dans le plasma où elle est liée à l'albumine.

Au niveau hépatique, la bilirubine libérée de l'albumine est glycuconjuguée par une glycuronyl transférase et excrétée dans la bile. Dans l'intestin, elle subit une déconjugaison partielle et une série de réductions qui conduisent à l'urobilinogène et au stercobilinogène.

Ceux-ci sont en partie réabsorbés et subissent un cycle entérohépatique. Enfin, l'urobiline est éliminée dans les urines et le stercobilinogène dans les selles (Meftah 2016).

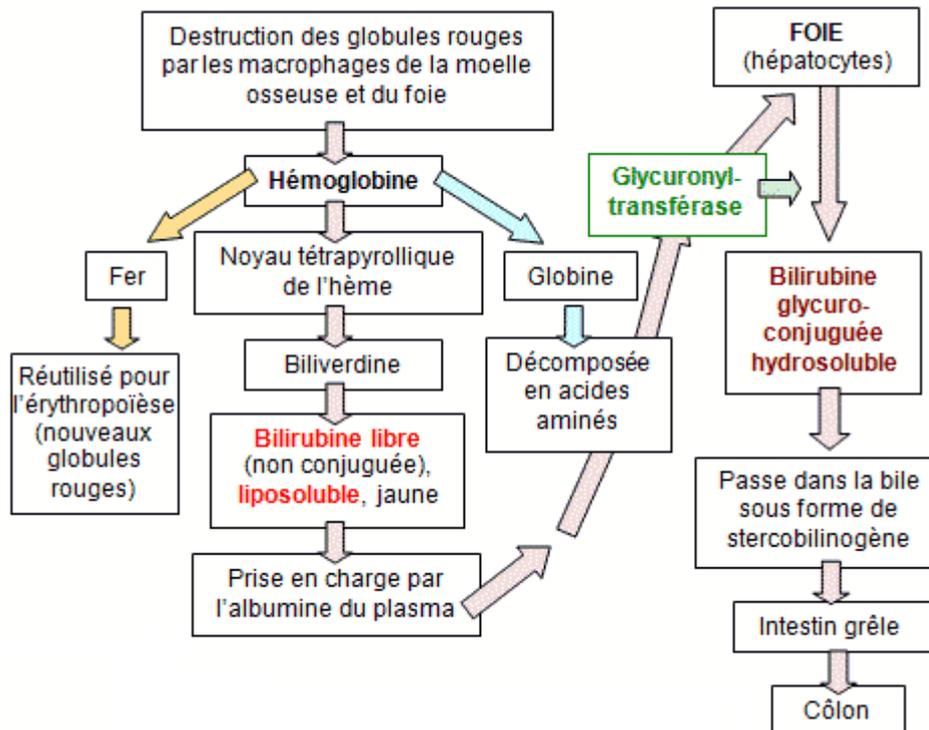


Figure7:schéma d'hémolyse intratissulaire (Meftah 2016).

2.2.2 Hémolyse pathologique

L'hémolyse pathologique peut être extra- ou intra-vasculaire. Ceci dépend du mécanisme causal et de la brutalité avec laquelle la membrane érythrocytaire est attaquée (Meftah 2016).

2.2.2.1 Hémolyse intravasculaire

La lyse du GR provoque la libération de ses composants (Hb, LDH, potassium) dans le plasma où leur concentration augmente (Figure 8). L'Hb, libérée lors d'une hémolyse, se lie à une α_2 globuline : l'haptoglobine. Les complexes haptoglobine-Hb sont absorbés par les cellules hépatiques qui catabolisent l'Hb et transforment l'hème en bilirubine.

Lorsque la libération d'Hb est suffisante (0,5 à 1,5 g/L d'Hb libre), la concentration en haptoglobine plasmatique chute. L'Hb se lie alors à une autre protéine, l'hémopexine ; ce

complexe est éliminé par le foie. En cas de saturation, l'Hb peut se lier à l'albumine. L'Hb libre prend trois voies :

- Métabolisation par le foie ;
- Filtration glomérulaire, réabsorption tubulaire et en cas de saturation tubulaire : hémoglobinurie ;
- Oxydation en méthémoglobine.

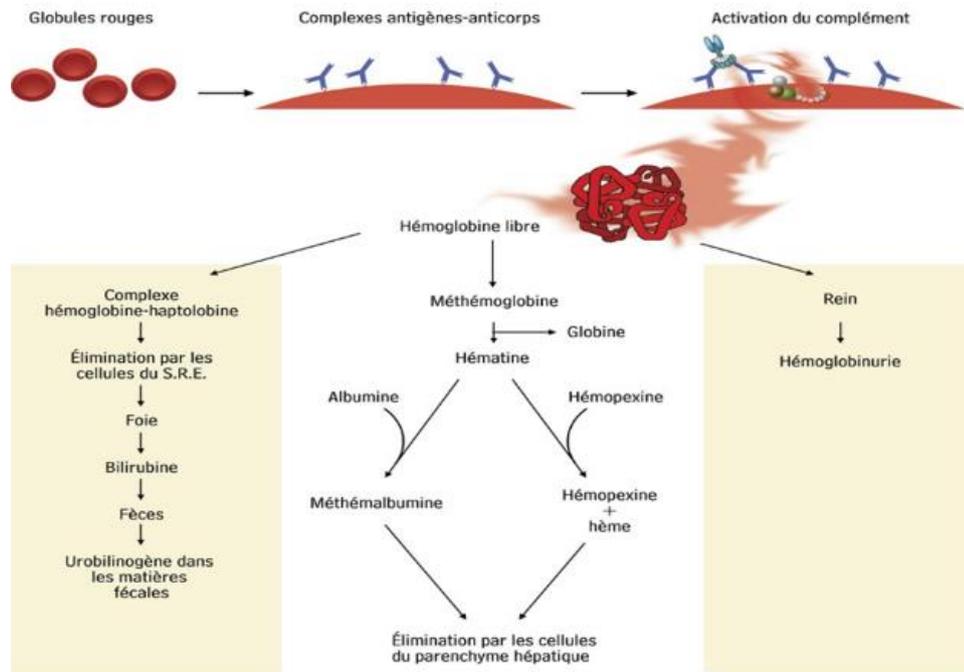


Figure 8:Schéma d’hémolyse intravasculaire. - SRE : système réticulo-endothélial appelé actuellement système des phagocytes mononucléés(*Meftah 2016*).

L’organisme réagit à cette perte du volume globulaire sanguin en augmentant l'érythropoïèse qui se caractérise par une érythroblastose médullaire conduisant à une réticulocytose, et souvent à une macrocytose. Si l’hémolyse persiste, l’anémie s’instaure (*Burnat et al. 1998*).

2.2.2.2 Hémolyse extravasculaire

Elle est liée à la destruction des hématies par le système macrophagique (Figure 9). Il s’agit notamment des hématies sensibilisées par la fixation d'anticorps à leur surface. L’Hb libérée dans la circulation, faisant chuter la concentration d’haptoglobines et augmentant celle de la bilirubine(*Burnat et al. 1998*).

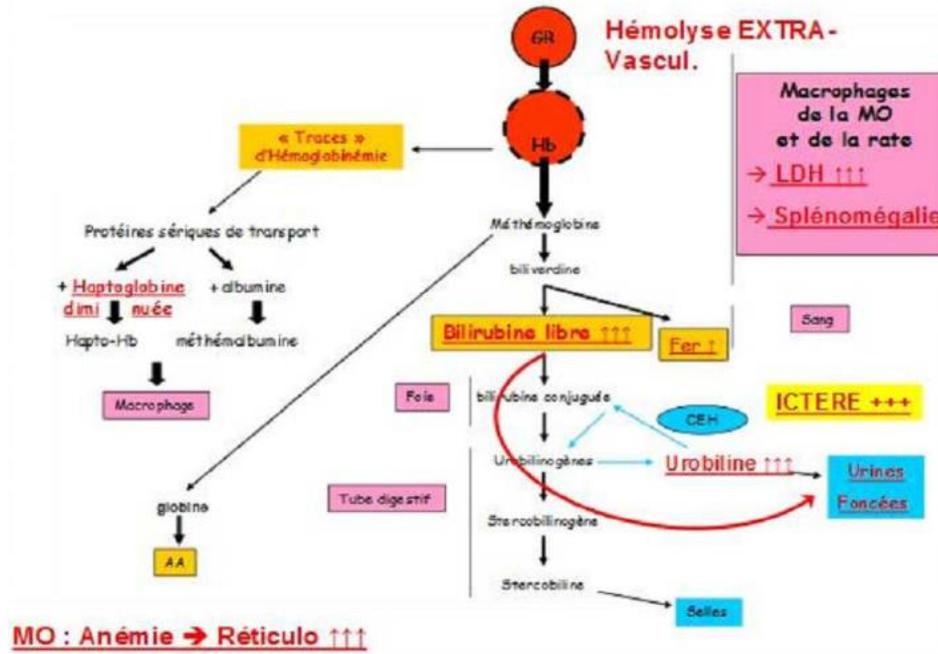


Figure9:Hyperhémolyse extravasculaire(Meftah 2016).

2.3 Types de maladies hémolytiques

Les anémies hémolytiques (AH) sont habituellement régénératives, macrocytaires et normochromes. On distingue les AH corpusculaires, liées à une anomalie d'un des constituants du GR, des AH extra-corpusculaires, où l'hémolyse est liée à un facteur extrinsèque(Figure 10). Les AH corpusculaires sont toutes d'origine constitutionnelle en dehors de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) alors que les AH extra-corpusculaires sont acquises(Godeau et Michel 2014).

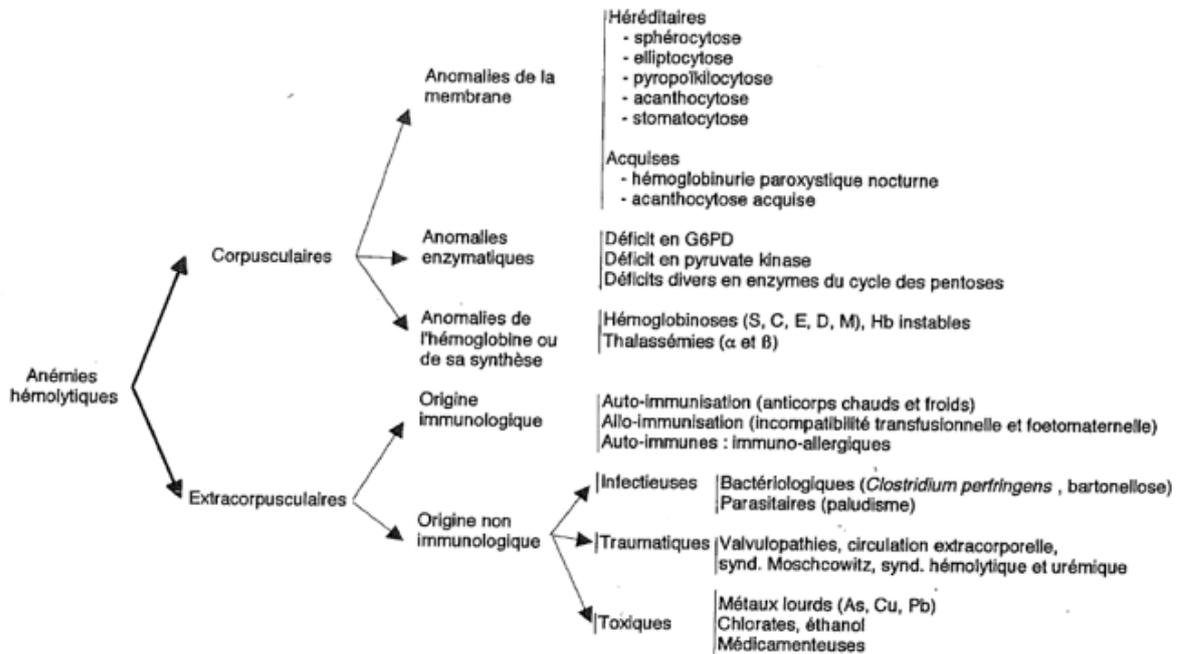


Figure 10: Classification des anémies hémolytiques (Burnat et al. 1998).

2.3.1 Anémies hémolytiques corpusculaires

Ce sont des malformations intrinsèques rendent les hématies anormalement sensibles aux processus physiologiques de l'hémolyse.

2.3.1.1 Anomalie de la membrane érythrocytaire

a. Héréditaires

Définies et dénommées par les modifications morphologiques des hématies observées sur les frottis, elles peuvent correspondre à des altérations génétiques multiples sur des protéines très différentes (Burnat et al. 1998).

Les anomalies de la membrane sont de deux sortes, il peut s'agir d'une perte de déformabilité (sphérocytose ou élliptocytose) ou d'anomalies de perméabilité entraînant une fragilité accrue du GR par modification de son état d'hydratation (stomatocytose à cellules déshydratées ou hyperhydratées) (Loustau et al. 2011).

- **Sphérocytose héréditaire ou maladie de Minkowski-Chauffard** : c'est la plus fréquente, de transmission dominante ou récessive. A l'examen des frottis, les hématies sont de petite taille, sphériques et denses (sphérocytes).

- **L'élliptocytose héréditaire** : est une affection génétique de transmission récessive ou dominante caractérisée par la forme allongée des hématies. L'expression clinique est variable allant des formes frustes de découverte fortuite jusqu'aux formes graves exigeant des transfusions régulières (*Benachi et al. 2014*).

- **Stomatocytose héréditaire** : affection rare autosomale dominante se traduisant par une AH légère ou modérée ; le frottis est caractérisé par la présence de stomatocytes : hématies présentant une dépression centrale évoquant une bouche associée à une perméabilité membranaire accrue (*Burnat et al. 1998*).

b. Acquises

- **L'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne** : est liée à l'expansion clonale de cellules hématopoïétiques non malignes ayant une mutation somatique du gène PIG-A. Il en résulte un défaut de synthèse des molécules d'ancrage (GPI) responsables de la fixation de nombreuses protéines à la surface membranaire, notamment des protéines inhibitrices du complément telles que CD59 ou CD55. Le frottis sanguin est classiquement normal. Le diagnostic repose sur la cytométrie en flux, qui met en évidence le déficit d'expression en CD55 et CD59, liées au GPI, au niveau des GR et des leucocytes.

- **Acanthocytose acquises** : une acanthocytose correspond à une déformation des GR, qui deviennent spiculés suite à la modification de la composition lipidique de leur membrane, et sont ainsi détruits après séquestration splénique. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'acanthocytes sur le frottis (*Loustau et al. 2011*).

2.3.1.2 Anémies hémolytiques par déficit enzymatique

a. Déficit en G6PD

C'est la carence en G6PD est l'enzymopathie la plus courante des GRs. Le mode de transmission est lié au sexe car le gène de la G6PD est situé sur le chromosome X, donc le déficit n'est trouvé que chez les hommes, mais par suite de la fréquence de ce déficit, les femmes ayant 2 X atteints ne sont pas rares et donc le déficit peut s'exprimer cliniquement également chez elles (*Dorche 2000*). La G6PD est la seule source de production du NADPH, H⁺, coenzyme de la glutathion réductase. Le NADPH réduit permet la

régénération du glutathion, dont le rôle est la neutralisation des peroxydes, très toxiques pour le GR (*Mura et al. 2009*).

b. Le déficit en pyruvate kinase (PK)

La PK convertit le phosphoénolpyruvate en lactate, générant ainsi de l'ATP. Une carence en PK entraîne une déplétion de l'ATP et une augmentation du 2,3-DPG. Les cellules appauvries en ATP sont rigides en raison de la perte de potassium et d'eau, et les GRs rigides sont plus susceptibles d'être détruits dans la rate. Le diagnostic repose sur l'absence d'une AH sphérocytaire avec des taux normaux de G6PD. Les patients symptomatiques ont généralement une activité enzymatique PK comprise entre 5% et 40% de la normale (*Haley 2017*).

Le mode de transmission est du type récessif autosomique, et le gène de l'isoenzyme PK1 trouve dans les érythrocytes est porté par le chromosome 1 en position q21. Il a été cloné et de nombreuses mutations caractérisées (*Dorche 2000*).

2.3.1.3 Anémies hémolytiques par anomalies de l'hémoglobine

On distingue 2 catégories principales d'AH par anomalie de l'Hb : les syndromes thalassémiques liés à un défaut quantitatif de synthèse d'une chaîne de globine et les anomalies structurales de l'Hb : les hémoglobinopathies. Dans ce dernier groupe, la drépanocytose est la plus fréquente, les hémoglobinoses C et E le sont moins et les Hbs instables sont rares (*Benachi et al. 2014; Loustau et al. 2011*).

a. Les syndromes thalassémiques

Les thalassémies sont définies par une diminution de synthèse d'une des chaînes de globine et désignées par la chaîne déficiente : α -thalassémie, β -thalassémie (*Benachi et al. 2014*).

b. Les hémoglobinopathies

Ce sont des troubles de l'Hb héréditaire autosomique dominante, causé par des défauts structurels résultant d'une mutation sur un gène de structure (α ou β) se traduit par une modification de la séquence d'acides aminés (AA) des chaînes α ou β et donc la production d'une Hb anormale, elle correspond aux variants de l'Hb (*Burnat et al. 1998; Kohne 2011*).

2.3.2 Anémies hémolytiques extracorporelles

2.3.2.1 Anémies hémolytiques d'origine immunologique (AHI)

Les AHI sont médiées par des anticorps (Ac) dirigés contre les antigènes (Ag) à la surface des GRs. L'AHI est classée comme auto-immune, allo-immune ou induite par un médicament, sur la base de l'Ag qui stimule la destruction des GRs par les Acs ou par le complément.

a. Anémie hémolytique auto-immune (AIHA)

L'AIHA est médiée par des auto-Acs et subdivisée en : hémolyse chaude fait référence aux auto-AcsIgG, qui sont hautement fixés aux GRs à la température corporelle (37°C), et une hémolyse froide à auto-AcsIgM qui nécessite des températures plus basses (0 à 4°C).

Lorsque les IgG se fixent aux Ags des GRs, ces derniers sont partiellement ingérés par les macrophages de la rate, laissant des microsphérocytes, qui sont caractérisés l'AIHA. Ces sphérocytes, qui ont une déformabilité réduite par rapport aux GRs normaux, sont piégés dans les sinusoides spléniques et retirés de la circulation.

b. Anémie hémolytique allo-immune

L'hémolyse allo-immune la plus sévère est une réaction transfusionnelle aiguë causée par des GRs incompatibles avec ABO. Par exemple, la transfusion de GRs A dans un receveur O (qui a des IgM anti-A circulants) conduit à une fixation complémentaire et à une hémolyse intravasculaire rapide (*Dhaliwal, Cornett et Lawrence 2004*).

Aussi la maladie hémolytique du nouveau-né par incompatibilité rhésus, ABO et autres.

c. Anémie hémolytique médicamenteuses et/ou immuno-allergiques

Différents mécanismes ont été décrits :

- Fixation du médicament ou de ses métabolites sur l'hématie, les Acs spécifiques dirigés contre le médicament formant un complexe activant le complément (ex : pénicilline).
- Absorption de complexes immuns Acs-médicaments sur les érythrocytes par l'intermédiaire du groupement Fc, ce qui active le complément (rifampicine, quinine, phénacétine) (*Burnat et al. 1998*).

2.3.2.2 Anémies hémolytiques d'origine non immunologique

a. Infectieuses

L'agent infectieux le plus fréquemment responsable d'AH est le Plasmodium par une action directe sur les GRs. Les bactériémies à *Clostridium Perfringens* sont classiquement sources d'hémolyses intravasculaires sévères liées à l'action d'une toxine, mais d'autres bactéries peuvent épisodiquement causer des toxi-infections responsables d'AH telle que *E.Coli*, Streptocoque, Staphylocoque...etc.

Certains agents infectieux peuvent révéler ou aggraver des AH corpusculaires sous-jacentes (déficit en G6PD, thalassémies, drépanocytose)(*Loustau et al. 2011*).

b. Toxiques

Les hémolyses toxiques d'origine immunologiques, par divers mécanismes, concernent certains médicaments comme : céphalosporine, pénicilline, etc. ou d'origine oxydative (dapsonne, nitrofu-rantoïne, sulfamide, etc.) ou des toxiques industriels (anilines, chlorates, nitrites, etc.).

Des mécanismes toxiques plurifactoriels sont impliqués dans les intoxications par les métaux lourds comme le plomb (saturnisme), le cuivre (intoxication accidentelle ou maladie de Wilson) et les venins (araignées et serpents)(*Benachi et al. 2014*).

c. Hémolyses mécaniques par fragmentation des hématies

La fragmentation des hématies est à l'origine d'une anomalie morphologique caractéristique : le schizocyte. Ce sont des hémolyses extracorporelles intravasculaires. Les hémolyses mécaniques s'observent chez les patients porteurs de valvulopathies non opérées, prothèses valvulaires synthétique ou de greffe, ou en cas de circulation extracorporelle (hémodialyse chronique)(*Benachi et al. 2014; Burnat et al. 1998; Tabbara 1992*)

3 Anti-hémolytiques

3.1 Définition

Le traitement de l'anémie hémolytique dépend de la cause. Les médicaments anti-hémolytiques sont des substances d'origine synthétiques ont la capacité à retarder ou à

inhiber la lyse des globules rouges. Plusieurs existent, nous citerons l'acide folique, le complément de fer, la vitamine B₁₂ et les corticoïdes (*Bachy, Houot, et Dony 2015*).

3.2 Action des anti-hémolytiques synthétiques

- **Le fer** : Il est absorbé au niveau duodéal sous forme de fer ferreux (Fe²⁺). Le fer assure la synthèse de l'hème dans les mitochondries. Le Fe²⁺ et la protoporphyrine vont donner l'hème, qui passe alors dans le cytoplasme. L'hème est ensuite associé à des chaînes de globines (α_2, β_2) pour former l'Hb. Une fois les stocks du fer sont épuisés, le fer plasmatique sera diminué et l'érythropoïèse est ralentie.

- **Vitamine B₁₂ et folates** : appelés anti mégalo-blastiques, leurs actions biochimiques sont étroitement liées ; V B₁₂CO-enzyme dans la conversion du méthyl-FH₄ en FH₄. Ils sont intervenus dans la synthèse de l'ADN et donc dans la division cellulaire, par conséquent, En pathologie, toutes les situations d'érythropoïèse accélérée (hémolyse, hémorragie...) entraîneront une consommation plus grande de ces vitamines donc les réserves étant faibles. L'absence de l'un des deux, aboutissant à une hématopoïèse inefficace à cause d'une différenciation érythroblastique anormale avec des précurseurs érythrocytaires anormaux avec un ratio ARN/ADN élevé et de grands érythrocytes fragiles circulants (*Dubost et Dupuis 2011*).

- **Les corticoïdes** : Essentiellement pour les AHAI à anticorps chauds (cortisone ou un de ses dérivés). Ce type de médicament permet d'enrayer la destruction accrue des GRs. Les corticoïdes sont ici employés comme traitement symptomatique pour diminuer les réactions immunitaires, ils ne ciblent pas l'anticorps responsable de l'affection (*Pierrel 2015*).

3.3 Action des antihémolytiques naturels (polyphénoliques)

Parce que les médicaments ont des effets secondaires et indésirables, le domaine de la recherche scientifique orienter son intérêt vers des substances anti hémolytiques d'origine végétales. De nombreuses études sur différentes plantes démontrent l'effet antihémolytique (Tableau 2).

Le mécanisme de l'action protectrice d'antioxydants naturels sur les organismes au niveau moléculaire et au niveau cellulaire fait encore l'objet d'un débat considérable.

Cependant, il a été suggéré que les polyphénols ont la capacité de stabiliser la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique. Cette activité est effectuée grâce à la répartition des composés phénoliques dans les membranes cellulaires et la restriction qui en résulte sur la fluidité de la membrane pourrait gêner stériquement la diffusion des radicaux libres et ainsi diminuer la cinétique des réactions radicalaires (*Suwalsky et al. 2007*).

Tableau 2:exemples de plantes médicinales douées d'activité antihémolytique

Source végétale (source)	Tests utilisés	Effets	Références
Extrait de <i>Acaciahydasypica R. Parker</i>	Hémolyse induite par le H ₂ O ₂	Activité antihémolytique 79,3 % pour 1000 (µg/ml)	(Afsar et al., 2016)
Extrait de <i>Hyssopusofficinalis L. Var. angustifolius</i>	Hémolyse induite par le H ₂ O ₂	IC ₅₀ = 19,47 ± 0,73 µg/ml	(Alinezhad et al. 2013)
Extrait de fleurs <i>loquat</i>	Hémolyse induite par le H ₂ O ₂	IC ₅₀ = 258,2 µg/ml	(S. F. Nabavi et al. 2015)
Extrait de <i>Menthapiperrita</i>	Hémolyse induite par le H ₂ O ₂	IC ₅₀ = 836,4± 29,2 µg/ml	(Ebrahimzadeh et al., 2010)
Extrait de feuilles de <i>Piper betel</i>	Hémolyse induite par le H ₂ O ₂	Activité antihémolytique 93,65 % pour 0,1mg / ml	(Chakraborty et Shah, 2011)
Extrait de propolis	Hémolyse induite <i>in vivo</i> par le HgCl ₂	Activité antihémolytique 13,20 % pour 200 mg/kg/jour	(Ercis et al., 2015)

Chapitre III

Méthodes d'étude in vitro de l'hémolyse

Le principe d'hémolyse effectuée *in vitro* est basé sur l'effet des paramètres physicochimiques sur la membrane des GRs telles que le milieu hypotonique, l'utilisation de perturbateurs membranaires comme les espèces réactives oxygénées, les températures élevées. Tous ces facteurs, provoquent une rupture de la membrane cytoplasmique et par conséquent la libération de l'hémoglobine qui sera alors dosé par spectrophotométrie d'absorbance.

1. Préparation de la suspension érythrocytaire

La suspension érythrocytaire est préparée selon la méthode décrite par Ebrahimzadeh et ses collaborateurs (2010) suivant laquelle 5 ml de sang humain sont collectés dans des tubes à EDTA puis centrifugés ($1500 \times g$ pendant 10 min) à 4 °C. Les érythrocytes sont séparés du plasma et de la couche leucocytaire en effectuant trois lavages dans 10 volumes de solution saline tamponnée au phosphate 10 mM (pH 7,4 ; PBS) tout en effectuant des étapes de centrifugation ($1500 \times g$, 5 min). Les couches surnageantes des globules blancs sont soigneusement retirées à chaque lavage. Les érythrocytes lavés sont ensuite stockés à 4 °C et utilisés dans les 6 h pour des études supplémentaires (*Ebrahimzadeh et al. 2010*).

2. Test de l'innocuité de la substance à tester vis-à-vis des érythrocytes

Avant d'évaluer l'effet antihémolytique de la substance à tester, il est indispensable d'effectuer un test d'innocuité de cette substance. Ce test a pour objectif de déterminer les concentrations qui doivent être utilisés pour tester l'activité antioxydante en maintenant l'innocuité de cette substance vis-à-vis des érythrocytes.

Principe

Ce test est basé sur le contact des GRs avec la substance à tester à différentes concentrations dans une solution isotonique. Le suivie de la concentration des cellules hémolysées est effectué par l'observation microscopique et la mesure du pourcentage d'hémolyse.

Mode opératoire

La méthode suivie est celle rapportée par Okoko et Ere (2012) selon laquelle, la solution d'hématies (10%) est préparée. Ensuite un volume de 0,8ml de la substance à tester à différentes concentrations (100, 150, 250, 350, 450, 550, 650, 750, 850,1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$) est ajouté à 0,2 ml de la solution d'hématies (10%). L'incubation se fait à 37°C pendant 30min,

ensuite une centrifugation à 3000 tpm pendant 10min est effectuée avant la lecture de la densité optique à 470 nm (*Okoko et Ere 2012*).

Expression des résultats

Le pourcentage d'hémolyse est calculé selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{\text{DOe}}{\text{DOc}} \times 100$$

Où

DOe est la densité de l'échantillon

DOc est la densité du contrôle (solution hypotonique).

3. Activité antihémolytique de la substance à tester contre l'hémolyse induite par H₂O₂

Mode opératoire

L'hémolyse érythrocytaire a été réalisée avec H₂O₂ comme initiateur de radicaux libres selon la méthode décrite par Ebrahimzadeh et ses collaborateurs (2010) suivant laquelle une solution d'hématies (5%) est préparée dans le PBS. À 100 µl de suspension à 5%, 50 µl de la substance à tester et de la vitamine C à différentes concentrations (100-1000 µg dans du PBS pH 7,4), a été ajouté. Ensuite 100 µl de H₂O₂ (1M dans du PBS pH 7,4) ont été ajoutés. Les mélanges réactionnels ont été agités doucement tout en étant incubés à 37 °C pendant 3 h. Les mélanges réactionnels ont été dilués avec 8 ml de PBS et centrifugés à 2000 g pendant 10 min. L'absorbance des surnageants résultants a été mesurée à 540 nm pour déterminer l'hémolyse.

De même, les érythrocytes ont été traités avec 100 µM de H₂O₂ et sans inhibiteurs (la substance à tester) pour obtenir une hémolyse complète (control : 100% H₂O₂ non réduit). L'absorbance des surnageants a été mesurée dans les mêmes conditions (*Ebrahimzadeh et al. 2010*).

Expression des résultats

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé en prenant l'hémolyse à 100% causée par 100 µM de H₂O₂. Les valeurs IC₅₀ ont été calculées à partir des graphiques et elle correspond à la concentration d'antioxydant requise pour l'inhibition de l'hémolyse à 50%.

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{(\text{DOc} - \text{DOe})}{\text{DOc}} \times 100$$

Où

DOe est la densité de l'échantillon

Doc est la densité du contrôle (100% H₂O₂ non réduit).

4. Activité antihémolytique de la substance à tester contre l'hémolyse induite par le stress osmotique

Le protocole est réalisé selon la méthode de Louerred et al. (2016) selon laquelle deux étapes sont effectuées

Induction de l'hémolyse

Pour calculer la concentration du NaCl qui induit une hémolyse complète, 100µl de la suspension érythrocytaire (10% dans le PBS) sont ajoutés à 5ml de NaCl à différentes concentrations (de 2,5 à 7mg/ml dans le PBS). Après une incubation de 30min à température ambiante, une centrifugation pendant 10 min à une vitesse de 3000 tpm est effectuée, puis une lecture de la densité optique est faite à 540 nm. Un témoin négatif (NaCl isotonique 9mg/ml) et un témoin positif ; le contrôle (l'eau distillée) sont réalisés (*Louerred, Ammar, et Harche 2016*).

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé en suivant la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{\text{DO du test NaCl}}{\text{DO du contrôle}} \times 100$$

Effet de la substance à tester sur l'hémolyse induite par le NaCl

Pour réaliser ce test, 100 µl de la substance à tester ou de la molécule de référence à différentes concentrations (de 0,1-à 1mg/ml dans le PBS) sont ajoutés à 100µl de la suspension érythrocytaire (10% dans le PBS). Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante. Ensuite 5ml de NaCl à une concentration déterminée précédemment est ajouté. Le mélange est laissé incubé à 37°C pendant 30 min, puis centrifugé à 3000 tpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été lue à 540 nm. De même, un contrôle en absence de la substance à tester a été réalisé.

Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse a été calculé en suivant la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{\text{DO contrôle} - \text{DO échantillon}}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

5. Activité antihémolytique de la substance à tester contre l'hémolyse induite par le stress thermique

Mode opératoire

Le protocole est réalisé selon la méthode décrite par Sakat et ses collaborateurs (2010) suivant laquelle une suspension érythrocytaire (2%) est préparée et additionnée à 1ml de la substance à tester ou de l'aspirine à différentes concentrations (de 100 à 1000 µg/ml dans le PBS). Le mélange réactionnel est incubé dans un bain-marie à 56°C pendant 30 minutes puis les tubes sont immédiatement refroidis à l'eau du robinet. Après une centrifugation à 3000 tpm pendant 10 minutes à 4°C, l'absorbance du surnageant est estimée à 540 nm. Parallèlement, un control a été réalisé en remplaçant l'eau physiologique par 1 ml d'eau distillée provoquant ainsi une hémolyse totale (100 %) (*Sakat, Juvekar, et Gambhire 2010*).

Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par la chaleur est calculé toujours par l'équation précédente.

Discussion

Discussion

Les composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénoliques) sont les constituants les plus importants de la propolis et qui sont responsables de ses propriétés pharmacologiques (*Segueni et al. 2010*). Cependant, les constituants de la propolis varient considérablement en fonction du climat, de la saison, de l'emplacement géographique (*Kebsa et al., 2014*). Par conséquent, sa formule chimique change d'une région à une autre (*Segueni et al. 2011*).

La composition chimique de la propolis de l'est de l'Algérie (Jijel) a été étudiée dans de nombreuses études qui ont révélé que cette propolis avait des concentrations élevées de flavonoïdes (370 mg de flavonoïdes par gramme de propolis) et l'analyse HPLC a démontré que ces flavonoïdes sont la pinostrombinechalcone (38,91%), la galangine (18,95%), la naringénine (14,27%), la tectochrysin (25,09%), la méthoxychrysin (1,14%) et un composé de coumarine prénylésuberone (1,65%) (*Boussenane et al. 2009; Boutabet et al. 2011*).

Nous pouvons dire que d'après notre lecture, la teneur en flavonoïdes et en polyphénols de la propolis algérienne est comparable aux concentrations des propolis Brésiliennes verte, rouge et brune estimée à 315 ± 26 , 306 ± 29 et 344 ± 17 mg/g respectivement (*Daleprane et Abdalla, 2013*). Elle est également inférieure à la concentration de la propolis Chinoise qui est égale à $537,9 \pm 8,7$ mg/g (*Wang et al., 2015*). Cependant, notre propolis contient plus de polyphénols que celles de la Corée avec $212,7 \pm 7,4$ mg/g (*Choi et al., 2006*); de l'Argentine avec 187 mg/g (*Bankova et al., 2000*), de l'Inde avec $159,10 \pm 0,26$ mg/g (*Laskar et al., 2010*), du Portugal avec $151 \pm 0,01$ mg/g (*Moreira et al., 2008*), du Chypre avec $100,4 \pm 7,2$ mg/g (*Kalogeropoulos et al., 2009*) et enfin de la Thaïlande avec $31,2 \pm 0,7$ mg/g (*Kumazawa et al., 2004*).

L'une des propriétés les plus importantes des flavonoïdes est leur excellente capacité de piégeage des radicaux. L'activité de piégeage de l'extrait de propolis a été observée à des concentrations allant jusqu'à 0,12 mg/ml, montrant qu'elle est plus forte que celle du contrôle positif, la quercétine. En effet, à 1 mg/ml l'extrait de propolis présentait un pourcentage de réduction de 88,30 contre 75,51% pour la quercétine (*Boutabet et al., 2011*). Cette capacité peut s'expliquer par la structure chimique des acides phénoliques et des flavonoïdes présents dans l'extrait qui possède une capacité de donation d'hydrogène et forme un radical phénoxy stable (*Rice-Evans, 2004*).

D'une autre part et concernant l'activité antihémolytique, l'exposition des globules rouges à certains facteurs (milieu hypotonique, la chaleur, etc.), entraîne la lyse de leurs

membranes. Les études antihémolytiques révèlent la capacité de toute substance à stabiliser la membrane et à réduire le degré de lyse des globules rouges (*DimaJoujhel et al., 2017*).

D'après notre recherche d'articles effectuée uniquement sur la base de données MEDLINE et qui est interrogée par son interface PubMed, nous avons trouvé 227 articles faisant l'objet d'une étude sur l'activité antihémolytique. Ces nombreuses études suivent la chronologie d'apparition représentée par la figure 12.

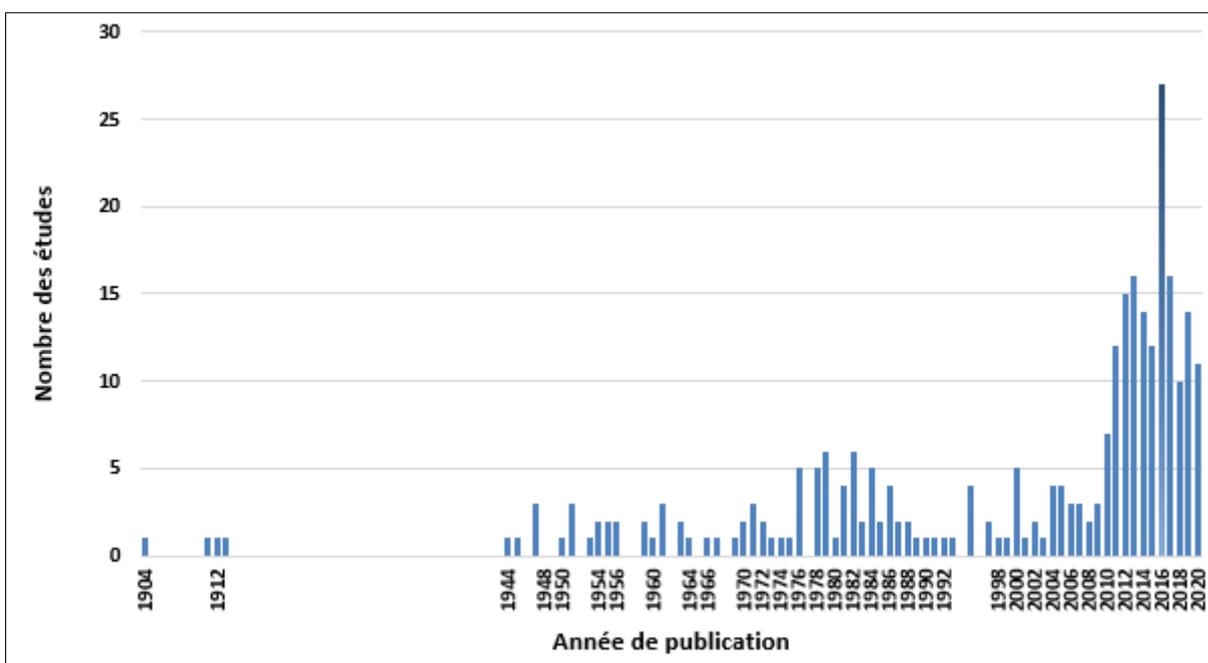


Figure 11: représentation graphique de la chronologie d'apparition des articles étudiant l'activité antihémolytique par année de publication.

Nous avons remarqué que la première étude est apparue en 1904 et qui portait sur l'action antihémolytique de certain constituant cellulaires et tissulaires (*Levene et Baldwin 1904*). Quelques études en 1911, 1912 et en 1913 sont basées sur l'activité antihémolytique de certains éléments contenus dans le sérum sanguin humain et animal et que leur action inhibitrice de l'hémolyse dépend d'un mécanisme directement anticomplémentaire (*Surface et Routt 1913; Zinsser et Johnson 1911*).

Depuis 1944 jusqu'à 2020, de nombreuses études sur cette activité ont vu le jour, testant différentes substances ; des substances des cellules hépatique d'origine Humain ou animales (*Tyler 1950, 1951*), la bilirubine (*Caroli et al. 1951*), une substance produite par la dégradation bactérienne de la digitonine (*Arnaudi 1951*), le détergent chlorure de dodécyl ammonium, la vitamine B₆ (*Love 1954; Selby et al. 1954*), sels de zinc (*Vishniakov 1959*), les

toxines diphtériques et des anatoxines (*Schiff 1964, 1961 ; Rybicka et Kudelski 1961*), vitamine E (*Fiala 1971; Skinner et al. 1971 ; Miyauchi et al. 1970*), les médicaments tensioactifs (*Rao et al. 1984*)...etc.

En 1976 est apparue la première étude de l'activité antihémolytique d'un extrait d'une plante et précisément les isoflavones de soja (*Naim et al. 1976*). Une autre étude en 2000 a étudié à la fois l'effet de la consommation à long terme de thé Rooibos ainsi que son extrait (*Simon et al. 2000*). Le pic de 27 études a été remarqué en 2016 où il a été étudié essentiellement l'activité antihémolytique des plantes et des produits naturels en prenant comme exemples l'effet de l'extrait méthanolique d'*Allium rotundum* L, l'extrait de germosprout de riz, les feuilles de *Senna velutina*, divers extraits des parties aériennes d'*Acacia hydaspica* R. Parker et l'extrait éthanolique de feuilles de lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn*) (*Assadpour et al. 2016; Hossain et al. 2016 ; Campos et al. 2016; Afsar et al. 2016; Pangjit et al. 2016*).

Actuellement, deux études sont apparues en 2020, l'une en août qui a étudié l'activité antihémolytique et d'autres activités biologiques des composés phénoliques des graines de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) (*Fidelis et al. 2020*). L'autre étude est apparue en septembre et qui est un aperçu complet sur les plantes appartenant au genre *Vicia* et leurs activités antihémolytiques et d'autres activités biologiques (*Salehi et al. 2020*).

Selon les recherches consultées, l'activité antihémolytique des plantes (de leurs extraits) ou des produits naturels est testée par deux modèles expérimentaux différents ; soit *in vitro*, soit *in vivo*. Ce sont les types d'études les plus courants que nous avons trouvés, soit 49,7% et 14,9% respectivement par rapport au total de 150 articles. On y trouve également, des articles de revue dont le pourcentage est à 2%. D'autres types d'articles qui représentent 33% sont des études comparatives, des rapports de cas, des revues systématiques... etc. (Figure 13).

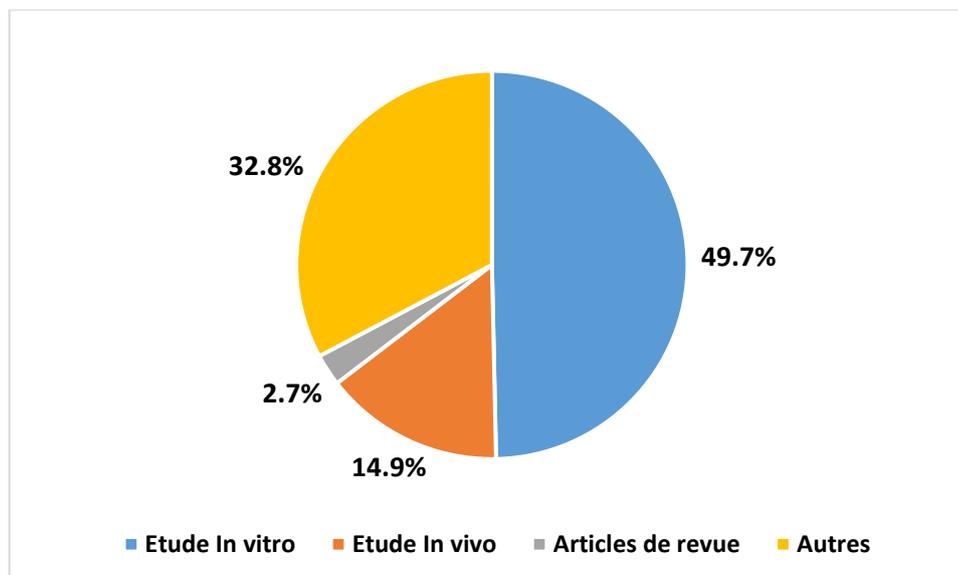


Figure 12: Représentation de la répartition des différents types d'études effectués sur l'activité antihémolytique.

Prenant en premier le modèle *in vivo* testant l'activité antihémolytique, il est réalisé sur des animaux tels que les souris, rats, lapins...etc. Ce type d'étude, comme a été fait par Ukab et ses collaborateurs (1981) est basé sur le marquage des GRs avec le Cr-51 puis les réinjecter aux lapins d'origines. La survie des érythrocytes après injection simultanément de 10 mg / kg d'APH (agent hémolytique) et 5% de xylitol (agent protecteur) a été augmentée d'environ 33% à 67% de la normale par rapport à la survie des GRs chez les lapins injectés avec l'APH seul (*Ukab et al.,1981*).

Une autre étude de Aouachria et ses collaborateurs (2017) basée sur l'administration, à des différents groupes de souris, des concentrations différentes de l'extrait brut de *Reichardia picroide* (EPR) Algérienne. L'activité antihémolytique de RPE est déterminée par sa capacité d'inhiber l'hémolyse oxydative induit *ex vivo* par l'AAPH (*Aouachria et al. (2017)*).

Concernant le deuxième modèle testant l'effet antihémolytique *in vitro*, la plupart des articles consultés étudient la capacité de différentes substances ou extraits à inhiber l'hémolyse oxydative où le H₂O₂ est l'agent hémolytique le plus utilisé.

D'autres articles utilisent d'autres méthodes d'hémolyse qui sont les suivants : les chocs osmotique (*Dunaevskaia et Shpakova 1997*), dichlorhydrate de 2,2'-azobis (2-méthylpropionamide) (*Alinezhad et al. 2012*), stress mécanique (*Bragueto Escher et al. 2019*), médicament amphipathique chlorpromazine (CPZ) ou l'acide flufénamique (FA)

(*Morimoto et al. 1995*), l'acide hypochloreux (HClO) (*Suwalsky et al. 2017*). Ce type d'étude *in vitro* teste l'activité antihémolytique des plantes ainsi que quelques molécules (flavonoïdes ou acides phénolique) d'origine végétale.

Le test *in vitro* précède généralement l'étude *in vivo* afin de s'assurer de la présence de l'effet antihémolytique de la substance avant de le tester sur les animaux. Nous citons l'exemple de l'étude de *Korpela, Vapaatalo, et Tähti (1983)* et *Korpela et Tähti (1984)* qui sont des études *in vitro* et *in vivo* respectivement testant l'effet antihémolytique du toluène. Aussi les études de (*Alinezhad et al. 2012*)et (*Nabavi et al. 2012*) qui sont des études *in vitro* et *in vivo* respectivement testant l'effet antihémolytique de différents extraits de *Primula heterochroma* Stapf.

Moghaddam et ses collaborateurs (2012) ont utilisé dans le même article les deux modèles *in vitro* d'abord ensuite *in vivo* pour tester l'effet antihémolytique de l'extrait de *Diospyros lotus* (*Moghaddam et al., 2012*). *In vitro*, l'extrait était capable de piéger le H₂O₂ d'une manière dépendante de la concentration et a montré une bonne activité (IC₅₀ = 923,51 ± 28,81 mg / ml) contre l'acide ascorbique avec IC₅₀ de 21,40 ± 1,10 mg / ml. Cependant, l'effet *In vivo* de l'extrait de *D. lotus* a montré une activité antihémolytique modérée IC₅₀ = 953,00 ± 27,54 µg / ml contre la vitamine C de IC₅₀ = 235,00 ± 8,21 µg / ml.

D'une autre part, d'après la lecture de plusieurs articles testant l'effet antihémolytique des extraits de plantes (*Aouachria et al. 2017 ; Raman et al. 2016 ; Alinezhad et al. 2012b; Nabavi et al. 2012 ; Naqinezhad et al. 2012 ; Heshmatollah et al. 2011 ; Chen et Deuster 2009 ; Chaudhuri et al. 2007; Naim et al. 1976;*), nous avons remarqué que les substances de la famille des flavonoïdes sont responsables de l'activité antihémolytique et plus exactement la classe des flavonols (*Dai et al. 2006*) et ceci est probablement due à leur structure phénolique, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques. Des études de relation structure-activité mettent en évidence la contribution importante des groupements OH phénoliques se situant en position C-3 du cycle C, C-3' et C-4' du cycle B, C-5 du cycle A. Par ailleurs, la présence dans le cycle C d'une double liaison stabilisatrice en position 2, 3-conjuguée avec la fraction 4-ceto, confère à ces composés une plus grande activité antioxydante (*Segueni et Rhouati 2011*).

L'activité antihémolytique des flavonoïdes contre l'hémolyse oxydative induite *in vitro* par les radicaux libres comme ceux libérés par le H₂O₂ et l'APPH représente le sujet de plusieurs études. Nous citons comme exemples l'étude de Naqunezhad et ses collaborateurs

(2012) qui ont montré que la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait d'*Artemisia tschernieviana* Besser, riche en flavonoïdes ($76,28 \pm 5.4$ mg équivalent quercétine/g d'extrait), présente une grande activité antihémodolytique avec $IC_{50} = 728,8 \pm 29$ $\mu\text{g/ml}$ contre l'hémolyse oxydative induite *in vitro* par le H_2O_2 (provoquant environ 90% d'hémolyse) comparable avec celle de l'acide ascorbique de $IC_{50} = 235 \pm 9$ $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Naqinezhad et al. 2012). Aussi, l'étude de Kandikattu et ses collaborateurs (2015) a révélé l'effet antihémodolytique de la fraction totale des flavonoïdes oligomériques à partir de *Cyperus rotundus* (390 ± 22 $\mu\text{g CE/mg}$ d'extrait). Cet extrait a une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ capable d'inhiber 50% l'hémolyse induite *in vitro* par le AAPH (100 mM provoquant 90% d'hémolyse) contre 80 % pour le vitamine C (100 $\mu\text{g/ml}$) (Kandikattu et al., 2015).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ($\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} et oxygène singulet) sont généralement les agents oxydants *in vivo*. Ils sont constamment générés dans notre corps en raison du métabolisme normal par la fuite d'électrons de la chaîne de transport d'électrons et par les activités des enzymes oxydoréductases. Les acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires sont particulièrement susceptibles d'être endommagés par la peroxydation lipidique. En particulier, les cibles de cette peroxydation sont l'acide linoléique et l'acide arachidonique. Dans le cas des érythrocytes, les lipides membranaires, lorsqu'ils sont soumis à un stress oxydatif considérable, perdent un atome d'hydrogène d'une chaîne d'acyle gras insaturé, initiant ainsi la peroxydation lipidique qui se propage sous forme de réaction en chaîne ; un radical initiateur peut induire jusqu'à vingt réactions de propagation. Par conséquent, les cellules ont développé des systèmes antioxydants à la fois enzymatiques ; comme la catalase et la superoxyde dismutase, et non enzymatiques ; principalement le glutathion, l' α -tocophérol, l'ascorbate pour lutter contre ces stress oxydatifs. Cependant, de tels antioxydants endogènes ne sont pas tout à fait suffisants dans des conditions de stress oxydatif extrême, d'où la nécessité de s'appuyer sur des antioxydants exogènes (Naqinezhad et al. 2012; Mendes et al. 2011 ; Dai et al. 2006 ; Chaudhuri et al. 2007b). Dans ce contexte, les flavonoïdes s'avèrent très efficaces pour lutter contre les dommages médiés par les radicaux libres, comme nous avons discutés précédemment dans l'activité antioxydante des flavonoïdes.

La propolis et un produit de la ruche qui provient des plantes et des arbres et qui contient plusieurs types de substances actives, acides phénoliques et flavonoïdes (Piccinelli et al. 2013). Elle possède plusieurs vertus et propriétés pharmacologiques telles que l'activité antioxydante (Rivero-Cruz et al. 2020), antimicrobienne (Afrouzan et al. 2018), antivirale

(*Silva-Beltrán et al. 2020*), antifongique (*Inouye, Takahashi, et Abe 2011*), inflammatoire (*Zeitoun et al. 2019*), anti-hyperglycémique (*Nna et al. 2018*) et des activités de protection hépato-rénale (*El Menyiy et al. 2018*), La propolis Algérienne a été testé pour son effet hématoprotecteur (*Lahouel et Fillastre 2004*), hépatoprotecteur (*Boussenane et al. 2009*), cardioprotecteur (*Braik et al. 2019; Alyane et al. 2008*) en se basant sur la réduction du stress oxydant engendré par certains toxiques ou maladies.

Cependant et concernant l'activité antihémolytique, nous n'avons trouvé qu'une seule étude de l'effet de la propolis sur l'hémolyse oxydative induite *in vitro* par le AAPH (*Bonamigo et al. 2017b*). Cette étude a testé l'extrait éthanolique de la propolis Brésilienne de deux espèces d'abeilles; *Scaptotrigona depilis* (EEP-S) et *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EEP-M). Bonamigo et ses collaborateurs, montre que l'EEP a une activité antihémolytique dépendante de la concentration et du temps. D'après les résultats de cette étude, la capacité de piégeage des radicaux libres et l'activité antihémolytique démontrée par l'EEP-M était plus efficace que celle des EEP-S, et ceci est probablement due à leurs compositions chimiques. L'analyse HPLC a démontré que les composants majeurs de l'EEP-M sont des flavonoïdes (apigénine, quercétine et lutéoline), ces composants sont complètement absents dans l'EEP-S. Donc on peut dire que les flavones (Apigénine) sont, probablement, les composants responsables de cette activité antihémolytique de l'EEP-M.

Une autre étude *in vivo* de Ercis (2015) a étudié l'effet protecteur de la propolis Turque pour des érythrocytes contre une intoxication expérimentale par le HgCl₂ chez les rats. Cette étude montre que la propolis possède un effet protecteur de 13,20% à une concentration de 200 mg/kg/jour contre l'hémolyse induit par le HgCl₂ (4 mg/kg/jour induit 88,30 % d'hémolyse). Les flavonoïdes sont les plus responsables de cette activité sont la pinocembrin 14,75%, la chrysin 7,67% et la galangin 4,90 % (*Ercis et al. 2015*).

La pinocembrine et la pinostrombine sont des flavonoïdes spécifiques à la propolis et à l'heure actuelle aucune étude n'a été faite sur leur activité antihémolytique. Cependant, la propolis Algérienne contient plusieurs flavonoïdes qui sont testés par d'autres études pour une activité antihémolytique. Ces flavonoïdes sont la chrysin identifiée par *Piccinelli et al. (2013)* et (*Soltani et al. 2017*) et dont l'activité antihémolytique est déterminés par *Chaudhuri et al. (2007)*. Le kaempférol et la myricétine identifiée par *Piccinelli et al. (2013)* et dont l'activité antihémolytique est déterminé par *Dai et al. (2006)*. C'est ce qui qualifie la propolis Algérienne pour une activité anti hémolytique importante.

In vitro des radicaux libres générés par L'AAPH et le H₂O₂ attaquent les érythrocytes pour induire l'oxydation en chaîne des lipides et des protéines, perturbant l'organisation membranaire et conduisant éventuellement à une hémolyse (*Mendes et al. 2011*).

Les flavonoïdes et plus précisément ; les flavonols réagiraient avec les radicaux peroxydes propageant la chaîne pour arrêter la peroxydation, inhibant ainsi l'hémolyse (*Dai et al. 2006*). A cet égard, leur interaction avec les membranes cellulaires, qui servent généralement de cibles pour la peroxydation lipidique, constitue un domaine de recherche important. A ce jour, et d'après la lecture de plusieurs articles récents, aucun mécanisme d'action claire des flavonoïdes en tant qu'antioxydants dans les membranes des globules rouges n'a été élucidé, ceci comprend leurs sites de liaison et d'autres aspects pertinents du processus de liaison.

Dans cet esprit, un certain nombre de théories possibles peuvent être postulées pour expliquer le(s) mécanisme(s) par lequel(s) ces flavonoïdes peuvent avoir une protection ordonnée contre la formation des ERO dans les globules rouges.

Certaines études, comme celle de Ajay Krishna (2018) ont montré que les polyphénols étaient capables de se localiser à la fois dans la membrane cellulaire et dans le cytosol des cellules endothéliales vasculaires, après une supplémentation parfois aussi courte que 30 min. A partir de ce constat, on peut dire que les polyphénols, y compris les flavonoïdes, pourraient également être capables de se localiser dans les différents milieux cellulaires des globules rouges. Donc, Il est possible que les flavonoïdes aient médié un piégeage direct des radicaux libres, soit lors de son passage à travers la membrane, soit une fois dans le cytosol. La stimulation d'autres mécanismes biologiques utilisés par les globules rouges pour se protéger des ERO tels que les systèmes enzymatiques antioxydants endogènes pourrait également être un facteur contributif, comme cela a été observé avec d'autres antioxydants (*Ajay Krishna et al. 2018*).

Chaudhuri et ses collaborateurs (2007) ont conclu que les flavonoïdes, d'après leurs études de plusieurs classes (à savoir la fisétine, la quercétine, la chrysin, la morine et la 3-hydroxyflavone, 3-HF), interagissent avec les composants lipidiques et protéiques des membranes des globules rouges. Ils ont trouvé que les flavonoïdes provoquent une extinction appréciable de la fluorescence tryptophane des protéines membranaires. C'est attribué à l'apparition de FRET, suggérant une proximité étroite des sites de liaison des flavonoïdes dans la membrane fantôme aux résidus tryptophane des protéines membranaires. Ils ont trouvé également que, en cas de liaison à la fisétine, des changements conformationnels de la

protéine membranaire semblent être induits, conduisant à l'exposition des résidus de tryptophane enterrés à l'environnement aqueux.

Les sites de liaison des flavonoïdes dans les membranes fantômes, déduits des études de fluorescence, jouent un rôle crucial dans la détermination de leurs propriétés antioxydantes. En outre, les flavonoïdes se sont avérés efficaces pour arrêter partiellement l'augmentation de la microviscosité des membranes fantômes (résultant de la peroxydation), ce qui est important pour maintenir le caractère déformable facile des érythrocytes. De plus, l'activité antihémolytique des flavonoïdes est liée à l'augmentation de l'intégrité membranaire des membranes érythrocytaires incorporées de flavonoïdes (*Chaudhuri et al. 2007*).

En conclusion et d'après ce qui a été discuté précédemment, on peut dire que la propolis, par ces flavonoïdes, peut être incorporé dans la membrane érythrocytaire et précisément à proximité des résidus tryptophane où elle exerce son effet antihémolytique qui dépendant de son activité antioxydante par le piégeage des radicaux libres et l'empêchement de la propagation de la peroxydation en chaîne, essentiellement, des phospholipides tout en maintenant l'intégrité membranaire, et en inhibant par la suite l'hémolyse de la cellule.

Conclusion

Conclusion

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a connu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. La propolis en tant que substance fabriquée à la base de nombreuses plantes, présente un grand intérêt thérapeutique qui ne cesse d'augmenter durant ces dernières années, et dans divers pays notamment en Algérie. Le but est de rechercher des principes actifs, dotés de diverses propriétés thérapeutiques, alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement.

Le présent mémoire est une synthèse bibliographique sur la propolis, sa composition et ses activités biologiques, les antioxydants phénoliques et leurs mécanismes d'action en général. Le processus d'hémolyse et les types des anémies hémolytiques sont aussi présentés.

Cette approche a pour objectif d'effectuer une lecture critique et une synthèse bibliographique des études portant sur l'activité antioxydante et antihémolytique de la propolis, tout en exposant un protocole expérimental pour tester l'effet antioxydant et antihémolytique de la propolis algérienne *in vitro*. L'outil documentaire utilisé pour la consultation des articles est PubMed, l'interface gratuite de la base de données en sciences biomédicales MEDLINE.

Nous avons pu conclure que la propolis possède un effet antioxydant avec un pouvoir réducteur du DPPH très important. La propolis possède également une activité antihémolytique très intéressante qui est due aux différents composants phénoliques de nature flavonoïdique. Le pouvoir d'inhibition de l'hémolyse des flavonoïdes est étroitement lié au piégeage des ERO initiateur de l'oxydation des lipides membranaires ainsi qu'à l'interruption de ce processus oxydatif suite à l'insertion des flavonoïdes dans la membrane cellulaire des érythrocytes.

En perspectives, des études *in vitro* sont nécessaires pour confirmer l'activité antihémolytique de la propolis algérienne ainsi que pour déterminer la dose pour laquelle elle est active. Des études *in vivo* sont également essentielles pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires des effets antioxydant et antihémolytique.

Références

Références

A

- ❖ Aberrane, Sadjia, et Massilia Mehalla. 2019. « Etude de l'activité anti-inflammatoire et antihémolytique de l'extrait aqueux de feuilles de *Malva sylvestris* L. » Thesis. Université Mouloud Mammeri.
- ❖ Achat, Sabiha. 2013. « Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques ». Université d'Avignon.
- ❖ Afrouzan, Houshang, Azar Tahghighi, Sedigheh Zakeri, et Ali Es-haghi. 2018. « Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis ». *Iranian Biomedical Journal* 22(1): 50-65.
- ❖ Afsar, Tayyaba et al. 2016. « Evaluation of Antioxidant, Anti-Hemolytic and Anticancer Activity of Various Solvent Extracts of *Acacia Hydasypica* R. Parker Aerial Parts ». *BMC complementary and alternative medicine* 16: 258.
- ❖ Ajay Krishna, Palanigounder Ganeshan et al. 2018. « Antioxidant and Hemolysis Protective Effects of Polyphenol-Rich Extract from Mulberry Fruits ». *Pharmacognosy Magazine* 14(53): 103-9.
- ❖ Alinezhad, Heshmatollah et al. 2012. « Antioxidant, Antihemolytic, and Inhibitory Activities of Endemic *Primula Heterochroma* against Fe^{2+} -Induced Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Rat Brain in Vitro ». *Pharmaceutical Biology* 50(11): 1391-96.
- ❖ Alyane, M et al. 2008. « Cardioprotective effects and mechanism of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity ». *Pak. J. Pharm.* 21(3): 201-9.
- ❖ Amoros, M., F. Sauvager, L. Girre, et M. Cormier. 1992. « In Vitro Antiviral Activity of Propolis ». *Apidologie* 23(3): 231-40.
- ❖ Anastasiou, Maria, Yves Chalandon, et Sandro Anchisi. 2018. « Anémie hémolytique dans le contexte de cancer ». *Revue médicale suisse* 14(607): 1021-27.
- ❖ Aouachria, Sana et al. 2017. « Acute, Sub-Acute Toxicity and Antioxidant Activities (in Vitro and in Vivo) of *Reichardia Picroide* Crude Extract ». *Journal of Ethnopharmacology* 208: 105-16.
- ❖ Arnaudi, C. 1951. « [Formation of an antihemolytic substance by bacterial degradation of digitonin] ». *Il Farmaco, Scienza E Tecnica* 6(5): 592-94.
- ❖ Assadpour, S. et al. 2016. « In Vitro Antioxidant and Antihemolytic Effects of the Essential Oil and Methanolic Extract of *Allium Rotundum* L ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20(24): 5210-15.

- ❖ Avan, Aslı Neslihan, Sema Demirci Çekiç, Seda Uzunboy, et Reşat Apak. 2016. « Spectrophotometric determination of phenolic antioxidants in the presence of thiols and proteins ». *International journal of molecular sciences* 17(8): 1325.

❖ **B**

- ❖ Bachy, Emmanuel, Roch Houot, et Arthur Dony. 2015. *Hématologie: Hématologie adulte et pédiatrique, Onco-hématologie*. Ellipses .
- ❖ Bankova, V., R. Christoy, G. Stoev, et S. Popov. 1992. « Determination of Phenolics from Propolis by Capillary Gas Chromatography ». *Journal of Chromatography A* 607(1): 150-53.
- ❖ Bankova, V.S., de Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. « Propolis: recent advances in chemistry and plant origin». *Apidologie* 31: 3-15.
- ❖ Bellebcir, L. 2008. « Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales ». *Mémoire de magister, Université Mentouri, Constantine, P 85*.
- ❖ Benachi, Alexandra, Dominique Luton, Laurent Mandelbrot, et Olivier Picone, éd. 2014. « Chapitre 11 - Pathologies hématologiques ». In *Pathologies maternelles et grossesse*, Paris: Elsevier Masson, 293-339.
- ❖ Beris, Photis, et Véronique Picard. 2015. « Non-Immune Hemolysis: Diagnostic Considerations ». *Seminars in Hematology* 52(4): 287-303.
- ❖ Boizot, Nathalie, et Jean-Paul Charpentier. 2006. « Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier ». *Cahier des Techniques de l'INRA*: 79.
- ❖ Bonamigo, Thaliny, Jaqueline Ferreira Campos, Alex Santos Oliveira, et al. 2017a. « Antioxidant and Cytotoxic Activity of Propolis of *Plebeia Droryana* and *Apis Mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado Biome ». *PLOS ONE* 12(9): e01839-83.
- ❖ Bonamigo, Thaliny, Jaqueline Ferreira Campos, Tamaeh Monteiro Alfredo, José Benedito Perrella Balestieri, Claudia Andrea Lima Cardoso, Edgar Julian Paredes-Gamero, Kely de Picoli Souza, et Edson Lucas dos Santos. 2017b. « Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona Depilis* and *Melipona Quadrifasciata Anthidioides* ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 1-12.

- ❖ Bousenane, Nadia et al. 2009. « Disruption of Mitochondrial Membrane Potential by Ferulenol and Restoration by Propolis Extract: Antiapoptotic Role of Propolis ». *Acta Biologica Hungarica* 60(4): 385-98.
- ❖ Boutabet, K., W. Kebsa, M. Alyane, et M. Lahouel. 2011. « Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin ». *Indian Journal of Nephrology* 21(2): 101-6.
- ❖ Bragueto Escher, Graziela et al. 2019. « From the Field to the Pot: Phytochemical and Functional Analyses of *Calendula Officinalis* L. Flower for Incorporation in an Organic Yogurt ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8(11).
- ❖ Braik, Asma et al. 2019. « Myocardial Protection by Propolis during Prolonged Hypothermic Preservation ». *Cryobiology* 88: 29-37.
- ❖ Burnat, P et al. 1998. « les anémies hémolytiques ». *Lyon Pharmaceutique* 49: 10-22.

❖ C

- ❖ Campos, Jaqueline Ferreira et al. 2016. « The Chemical Profile of *Senna Velutina* Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*: 84059-57.
- ❖ Cardinault, N., M. -O. Cayeux, et P. Percie du Sert. 2012. « La propolis : origine, composition et propriétés ». *Phytothérapie* 10(5): 298-304.
- ❖ Caroli, J., A. Charbonnier, R. Bernard, et B. Mendioroz. 1951. « [The antihemolytic role of bilirubin] ». *Acta Gastro-Enterologica Belgica* 14(12): 779-94.
- ❖ Chakraborty, Devjani, et Barkha Shah. 2011. « Antimicrobial, anti-oxidative and anti-hemolytic activity of piper betel leaf extracts ». 3: 8.
- ❖ Chaudhuri, Sudip et al. 2007. « Interaction of Flavonoids with Red Blood Cell Membrane Lipids and Proteins: Antioxidant and Antihemolytic Effects ». *International Journal of Biological Macromolecules* 41(1): 42-48.
- ❖ Chen, Chia-Nan, Chia-Li Wu, et Jen-Kun Lin. 2007. « Apoptosis of Human Melanoma Cells Induced by the Novel Compounds Propolin A and Propolin B from Taiwanese Propolis ». *Cancer Letters* 245(1-2): 218-31.
- ❖ Chen, Yifan, et Patricia Deuster. 2009. « Comparison of Quercetin and Dihydroquercetin: Antioxidant-Independent Actions on Erythrocyte and Platelet Membrane ». *Chemico-Biological Interactions* 182(1): 7-12.

- ❖ Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M. 2006. «Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea». *LWT - Food Sci. Technol.* 39 : 756-761.

❖ *D*

- ❖ Dai, Fang et al. 2006. « Protective Effects of Flavonols and Their Glycosides against Free Radical-Induced Oxidative Hemolysis of Red Blood Cells ». *Life Sciences* 78(21): 2488-93.
- ❖ Dalben-Dota, Kelen F. et al. 2010. « Antifungal Activity of Propolis Extract Against Yeasts Isolated from Vaginal Exudates ». *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 16(3): 285-90.
- ❖ Daleprane, J.B., Abdalla, D.S., 2013. «Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions». *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013: 1-8.
- ❖ Dhaliwal, Gurpreet, Patricia A. Cornett, et Jr Lawrence M. Tierney. 2004. « Hemolytic Anemia ». *American Family Physician* 69(11): 2599-2606.
- ❖ Di Carlo, Giulia, Nicola Mascolo, Angelo A. Izzo, et Francesco Capasso. 1999. « Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs ». *Life sciences* 65(4): 337-353.
- ❖ Dima, Joujeh, Lahdo Raghda, et Ghrewaty Abdul-Jalil. 2017. « Evaluation of Hemolytic and Anti-Hemolytic Activity of the Aerial Parts of Sonchus Oleraceus Extracts ». 10(3): 7.
- ❖ Djahra, Ali Boutlelis. 2014. « Etude phytochimique et activité antimicrobienne,antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L. » Université Badji Mokhtar de Annaba.
- ❖ Djeridane, A. et al. 2006. « Antioxidant Activity of Some Algerian Medicinal Plants Extracts Containing Phenolic Compounds ». *Food Chemistry* 97(4): 654-60.
- ❖ Djoudi, Melaz, et Souhila Ghebrioua. 2017. « Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de feuilles de citrus limon ». Thesis. Université Abderrahmane mira – Bejaia.
- ❖ Dolci, P, et O I Ozino. 2003. « Study of the in Vitro Sensitivity to Honey Bee Propolis of Staphylococcus Aureus Strains Characterized by Different Sensitivity to

Antibiotics ». *Ann. Microbiol.*: 11. Dorche, Claude. 2000. « Pathologie des enzymes de la glycolyse érythrocytaire ». *Revue Française des Laboratoires* 2000(324): 37-43.

- ❖ Dubost, Émilie, et Antoine Dupuis. 2011. « La prise en charge des anémies par carence ». *Actualités Pharmaceutiques Hospitalières* 7(26): 10-17.
- ❖ Dunaevskaia, O. N., et N. M. Shpakova. 1997. « [Protecting effect of trifluoroperazine during hyperosmotic erythrocyte shock] ». *Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal (1978)* 69(2): 30-34.

❖ E

- ❖ Ebrahimzadeh, M.A, S.F Nabavi, S.M Nabavi, et B Eslami. 2010. « Antioxidant and antihemolytic activities of mentha piperita ». *Pharmacologyonline* 9: 744-52.
- ❖ El Menyiy, Nawal et al. 2018. « Evaluation of Antiproteinuric and Hepato-Renal Protective Activities of Propolis in Paracetamol Toxicity in Rats ». *Nutrition Research and Practice* 12(6): 535-40.
- ❖ Ercis, K., S. Aydoğan, A. T. Atayoğlu, et S. Silici. 2015. « Effect of Propolis on Erythrocyte Rheology in Experimental Mercury Intoxication in Rats ». *Environmental Science and Pollution Research* 22(16): 12534-43.
- ❖ Erlund, Iris. 2004. « Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology ». *Nutrition research* 24(10): 851-874.

❖ F

- ❖ Fethoun, Marina, et Rosa Saheb. 2015. « Evaluation de l'activité antioxydant de différents extraits de *Foeniculum vulgare* ». Mémoire de Master. Université A. MIRA - Béjaïa.
- ❖ Fiala, J. 1971. « Antihemolytic effect of vitamin E in preserved blood at the temperature of 37 degrees C and 20 degrees C ». *Vnitřni Lekarství* 17(9): 851-56.
- ❖ Fidelis, Marina et al. 2020. « Response Surface Optimization of Phenolic Compounds from Jaboticaba (*Myrciaria Cauliflora* [Mart.] O.Berg) Seeds: Antioxidant, Antimicrobial, Antihyperglycemic, Antihypertensive and Cytotoxic Assessments ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 142: 1114-39.
- ❖ Freires, Irlan Almeida, Severino Matias Alencar, et Pedro Luiz Rosalen. 2016. « A Pharmacological Perspective on the Use of Brazilian Red Propolis and Its Isolated

Compounds against Human Diseases ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 110: 267-79.

❖ G

- ❖ Garratty, George. 2010. « Immune Hemolytic Anemia Associated with Drug Therapy ». *Blood Reviews* 24(4): 143-50.
- ❖ Ghedira, Kamel. 2005. « Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique ». *Phytothérapie* 3(4): 162-169.
- ❖ Godeau, B, et M. Michel. 2014. « Diagnostic des anémies hémolytiques ». *La Revue de Médecine Interne* 35: A18-21.
- ❖ de Groot, Anton C. 2013. « Propolis: A Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects ». *Dermatitis* 24(6): 263-82.
- ❖ Guizouarn, Hélène, Sonia Martial, et Franck Borgese. 2006. « Propriétés inattendues de l'échangeur anionique du globule rouge : la leçon des poissons ». *médecine/sciences* 22(10): 824-25.

❖ H

- ❖ Haley, Kristina. 2017. « Congenital Hemolytic Anemia ». *The Medical Clinics of North America* 101(2): 361-74.
- ❖ Hanasaki, Yukiko, Shunjiro Ogawa, et Shozo Fukui. 1994. « The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids ». *Free Radical Biology and Medicine* 16(6): 845-850.
- ❖ Havsteen, Bent H. 2002. « The biochemistry and medical significance of the flavonoids ». *Pharmacology & therapeutics* 96(2-3): 67-202.
- ❖ Heshmatollah, Alinezhad et al. 2011. « assessing the protective effect of primula heterochroma stapf extracts against sodium fluoride-induced hemolysis in rat erythrocytes ». *Research report Fluoride* 44(4): 238-42.
- ❖ Hider, Robert C., Zu D. Liu, et Hicham H. Khodr. 2001. « Metal chelation of polyphenols ». In *Methods in enzymology*, Elsevier, 190-203.
- ❖ Hossain, Shahdat et al. 2016. « Rice Germosprout Extract Protects Erythrocytes from Hemolysis and the Aorta, Brain, Heart, and Liver Tissues from Oxidative Stress In Vitro ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2016: 9587020.

❖ I

- ❖ Inouye, Shigeharu, Miki Takahashi, et Shigeru Abe. 2011. « [Composition, antifungal and radical scavenging activities of 4 propolis] ». *Medical Mycology Journal* 52(4): 305-13.
- ❖ Ivanovska, N. D. et al. 1995. « Immunomodulatory Action of Propolis. V. Anticomplementary Activity of a Water-Soluble Derivative ». *Journal of Ethnopharmacology* 47(3): 135-43.

❖ **K**

- ❖ Kalthoff, Sandra, et Christian P. Strassburg. 2019. « Contribution of Human UDP-Glucuronosyltransferases to the Antioxidant Effects of Propolis, Artichoke and Silymarin ». *Phytomedicine* 56: 35-39.
- ❖ Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V.T. 2009. «Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus». *Food Chem.* 116: 452-461.
- ❖ Kandikattu, Hemanth Kumar et al. 2015. « LC-ESI-MS/MS Analysis of Total Oligomeric Flavonoid Fraction of Cyperus Rotundus and Its Antioxidant, Macromolecule Damage Protective and Antihemolytic Effects ». *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* 22(4): 165-73.
- ❖ Kebieche, Mohamed. 2009. « Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante Ranunculus repens L. »
- ❖ Kebsa, Wided, Rouibah Hassiba, et Lahouel Mesbah. 2014. « Polyphenolic Fraction of Algerian Propolis Reverses Doxorubicin Induced Oxidative Stress in Liver Cells and Mitochondria ». *Pak. J. Pharm. Sci.:* 7.
- ❖ Kocot, Joanna et al. 2018. « Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 1-29.
- ❖ Kohne, Elisabeth. 2011. « Hemoglobinopathies ». *Deutsches Ärzteblatt International* 108(31-32): 532-40.
- ❖ Koleva, Irina I. et al. 2002. « Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods ». *Phytochemical Analysis* 13(1): 8-17.
- ❖ Korpela, M., et H. Tähti. 1984. « Follow-up of the Antihemolytic Effect of Toluene Inhalation in Rats ». *Toxicology Letters* 21(1): 15-19.

- ❖ Korpela, M., H. Vapaatalo, et H. Tähti. 1983. « Effect of Toluene on the Hemolytic Resistance of Rat Erythrocytes ». *Toxicology Letters* 17(3-4): 253-57.
- ❖ Kujumgiev, A et al. 1999. « Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin ». *Journal of Ethnopharmacology* 64(3): 235-40.
- ❖ Kumar, Shashank, et Abhay K. Pandey. 2013. « Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview ». *The scientific world journal* 2013.
- ❖ Kumazawa, Shigenori, Tomoko Hamasaka, et Tsutomu Nakayama. 2004. « Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins ». *Food Chemistry* 84(3): 329-39.
- ❖ Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., Nakayama, T. 2004. « A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan ». *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 260-262.

❖ *L*

- ❖ Lahouel, M, S Boulkour, N Segueni, et J. P Fillastre. 2004. « Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique ». *Pathologie Biologie* 52(6): 314-22.
- ❖ Lahouel, Mesbah, et Jean Paul Fillastre. 2004. « Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents ». *Copyright © Hellenic Society of Haematology HAEMA* 7(3): 313-20.
- ❖ Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N., Begum, N.A., 2010. « Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents ». *Food Chem.* 122: 233-237.
- ❖ Lecouffe-Desprets, M et al. 2019. « Hemolytic disorders and venous thrombosis: An update ». *Elsevier Masson SAS on behalf of Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI)*. 40(2019): 232-237.
- ❖ Levene, P. A., et E. R. Baldwin. 1904. « On the Antihemolytic Action of Some Cell and Tissue Constituents ». *The Journal of Medical Research* 12(2): 205-12.
- ❖ Louerred, Y, R Ammar, et M Harche K. 2016. « Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale Haloxylon scoparium POMEL ». *Journal of Bioresources Valorization* 1(1): 28.
- ❖ Loustau, Valentine et al. 2011. « Anémie hémolytique chez l'adulte : principales causes et démarche diagnostique ». *La Presse Médicale* 40(5): 470-85.

- ❖ Love, W. E. 1954. « The Hemolytic and Antihemolytic Action of Dodecyl Ammonium Chloride ». *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 44(2): 291-313.
- ❖ Lu, Li-Chang, Yue-Wen Chen, et Cheng-Chun Chou. 2005. « Antibacterial Activity of Propolis against Staphylococcus Aureus ». *International Journal of Food Microbiology* 102(2): 213-20.

❖ *M*

- ❖ Mărghitaș, Liviu Al, Daniel S. Dezmirean, et Otilia Bobiș. 2013. « Important Developments in Romanian Propolis Research ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1-9.
- ❖ Meftah, Amine. 2016. « les anémies hémolytiques auto immunes ». Thesis. Université MMohammed V-Rabat.
- ❖ Mendes, Lídia, Victor Freitas, Paula Baptista, et Márcia Carvalho. 2011. « Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit ». *Food and Chemical Toxicology* 49(2011): 2285–2291.
- ❖ Mezzou, Hicham et al. 2006. « Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de l'hémolyse en biochimie clinique ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2006(386): 59-64.
- ❖ Miyauchi, Y. et al. 1970. « Antihemolytic effect of alpha-tocopherol(vitamin E) during extracorporeal circulation ». *Kyobu Geka. The Japanese Journal of Thoracic Surgery* 23(5): 348-50.
- ❖ Moghaddam, Akbar Hajizadeh et al. 2012. « Antioxidant, Antihemolytic and Nephroprotective Activity of Aqueous Extract of Diospyros Lotus Seeds ». *Acta Poloniae Pharmaceutica* 69(4): 687-92.
- ❖ Mohandas, Narla, et Patrick G. Gallagher. 2008. « Red Cell Membrane: Past, Present, and Future ». *Blood* 112(10): 3939-48.
- ❖ Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L. 2008. «Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal ». *Food Chem. Toxicol.* 46: 3482-3485.
- ❖ Morera, Davinia, et Simon A MacKenzie. 2011. « Is There a Direct Role for Erythrocytes in the Immune Response? » *Veterinary Research* 42(1): 89.

- ❖ Morimoto, Y. et al. 1995. « Protective Effects of Neutral Amino Acids against Amphipathic Drug-Induced Hemolysis ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18(11): 1535-38.
- ❖ Muanda, François Nesmi. 2010. « Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques ». *Thèse de doctorat en Chimie organique. Ecole doctorale SESAMES Université Paul Verlaine-Metz* 294.
- ❖ Mura, M. et al. 2009. « Congenital hemolytic anemia due to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency ». *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial* 69(6): 551-55.

❖ *N*

- ❖ Nabavi, Seyed Fazel et al. 2015. « Antihypoxic, Nephroprotective and Antioxidant Properties of Hydro-Alcoholic Extract of Loquat Flowers ». *Progress In Nutrition* 17(3): 255-61.
- ❖ Nabavi, Seyed Mohammad et al. 2012. « Interaction of Different Extracts of Primula heterochroma Stapf. with Red Blood Cell Membrane Lipids and Proteins: Antioxidant and Antihemolytic Effects ». *Journal of Dietary Supplements* 9(4): 285-92.
- ❖ Naim, M., B. Gestetner, A. Bondi, et Y. Birk. 1976. « Antioxidative and Antihemolytic Activities of Soybean Isoflavones ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(6): 1174-77.
- ❖ Naqinezhad, A, Nabavi Sm, Nabavi Sf, et Ebrahimzadeh Ma. 2012. « Antioxidant and Antihemolytic Activities of Flavonoid Rich Fractions of Artemisia Tschernieviana Besser ». *European review for medical and pharmacological sciences* 16 Suppl 3.
- ❖ Nna, Victor Udo, Ainul Bahiyah Abu Bakar, Md Rizman Md Lazim Md Lazin, et Mahaneem Mohamed. 2018. « Antioxidant, Anti-Inflammatory and Synergistic Anti-Hyperglycemic Effects of Malaysian Propolis and Metformin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 120: 305-20.

❖ *O*

- ❖ Okoko, Tebekeme, et Diepreye Ere. 2012. « Antioxidant Activities of Solenostemon Monostachyus Leaf Extract Using in Vitro Methods ». *Scientific Research and Essays* 7(6): 621-26.

- ❖ Okutan, Huseyin, Nurten Ozcelik, H. Ramazan Yilmaz, et Efkan Uz. 2005. « Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Diabetic Rat Heart ». *Clinical Biochemistry* 38(2): 191-96.
- ❖ Oryan, Ahmad, Esmat Alemzadeh, et Ali Moshiri. 2018. « Potential Role of Propolis in Wound Healing: Biological Properties and Therapeutic Activities ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98: 469-83.
- ❖ Özcan, Musa. 2004. « Inhibition of *Aspergillus Parasiticus* NRRL 2999 by Pollen and Propolis Extracts ». *Journal of Medicinal Food* 7(1): 114-16.

❖ P

- ❖ Pangjit, Kanjana et al. 2016. « Iron-Chelating and Anti-Hemolytic Properties of Ethanolic Extract of Lotus (*Nelumbonucifera* Gaertn) Leaves ». *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet Thangphaet* 99 Suppl 1: S58-66.
- ❖ Pastre, Justine, et Nathalie Priymenko. 2007. « Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques ». *Revue de médecine vétérinaire* 1(4): 180-189.
- ❖ Pasupuleti, Visweswara Rao, Lakshmi Sammugam, Nagesvari Ramesh, et Siew Hua Gan. 2017. « Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 1-21.
- ❖ Peter Klinken, S. 2002. « def red blood cell.pdf ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*: 1514-18.
- ❖ Piccinelli, Anna Lisa et al. 2013. « Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian Propolis ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(21): 5080-88.
- ❖ Pierrel, Solène. 2015. « Effets thérapeutiques inattendus des corticoïdes : utilisation en oncologie et en neurologie ». Université de Lorraine.
- ❖ Pincemail, Joël, Karine Bonjean, Karine Cayeux, et Jean-Olivier Defraigne. 2002. « Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante ». *Nutrition clinique et métabolisme* 16(4): 233-239.
- ❖ Portier, Karine et al. 2007. « Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval ». *Annales de Médecine Vétérinaire* 151(2). Pretini, Virginia et al. 2019. « Red Blood Cells: Chasing Interactions ». *Frontiers in Physiology* 10: 945.

- ❖ Powers, Scott K., Ashley J. Smuder, Andreas N. Kavazis, et Matthew B. Hudson. 2010. « Experimental Guidelines for Studies Designed to Investigate the Impact of Antioxidant Supplementation on Exercise Performance ». *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 20(1): 2-14.
- ❖ Przybyłek, Izabela, et Tomasz M. Karpiński. 2019. « Antibacterial Properties of Propolis ». *Molecules* 24(11): 20-47.

❖ **R**

- ❖ Raman, Sivakumar Thasma et al. 2016. « In vitro and In vivo Antioxidant Activity of Flavonoid Extracted from Mulberry Fruit (*Morus alba* L.) ». *Pharmacognosy Magazine* 12(46): 128-33.
- ❖ Ramos, A. F. N., et J. L. Miranda. 2007. « Propolis: A Review of Its Anti-Inflammatory and Healing Actions ». *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 13(4): 697-710.
- ❖ Rao, M. N., S. B. Bhise, et R. C. Srivastava. 1984. « Antihemolytic Action of Surface Active Drugs ». *Indian Journal of Experimental Biology* 22(4): 222-23.
- ❖ Rivero-Cruz, J. Fausto et al. 2020. « Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9(1).
- ❖ Rolland, Yohan. 2004. « Antioxydants naturels végétaux ». *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 11(6): 419-424.
- ❖ Rossi, A. et al. 2002. « The Inhibitory Effect of Propolis and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cyclooxygenase Activity in J774 Macrophages ». *Phytomedicine* 9(6): 530-35.
- ❖ Rybicka, I., et Z. Kudelski. 1961. « On antihemolytic properties of diphtherial toxins and anatoxins ». *Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia* 13: 117-25.

❖ **S**

- ❖ Sakat, S, A.R Juvekar, et M.N Gambhire. 2010. « In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn ». *International Journal of Pharmacology and Pharmacological Sciences* 2(1): 146-55.
- ❖ Sakhri, L., B. Menecier, et A. Quoix. 2013. « Anémie hémolytique sous traitement par erlotinib ». *Revue de Pneumologie Clinique* 69(6): 345-50.

- ❖ Salehi, Bahare et al. 2020. « Vicia Plants-A Comprehensive Review on Chemical Composition and Phytopharmacology ». *Phytotherapy research: PTR*.
- ❖ Sawicka, Diana, Halina Car, Maria Halina Borawska, et Jacek Nikliński. 2012. « The Anticancer Activity of Propolis ». *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50(1): 25-37.
- ❖ Schiff, W. 1961. « [On an antihemolytic protective substance (“diphthin”), active in vivo, from Corynebacteria] ». *Pathologia Et Microbiologia* 24: 299-306.
- ❖ Schiff, W.. 1964. « [on the hemagglutinin fixation mechanism of the antihemolytic substance diphthin] ». *Zeitschrift Fur Immunitats- Und Allergieforschung* 127: 266-95.
- ❖ Segueni, Narimane, et Salah Rhouati. 2011. « Contribution à l’étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis ». Université Mentouri de Constantine
- ❖ Selby, P. N., H. N. Christensen, et T. R. Riggs. 1954. « An Antihemolytic Action of Pyridoxal ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 85(3): 388-89.
- ❖ Sforcin, J.M. 2007. « Propolis and the Immune System: A Review ». *Journal of Ethnopharmacology* 113(1): 1-14.
- ❖ Shinmei, Yoshifumi et al. 2009. « Effect of Brazilian Propolis on Sneezing and Nasal Rubbing in Experimental Allergic Rhinitis of Mice ». *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 31(4): 688-93.
- ❖ Silva-Beltrán, Norma Patricia, Ana Paola Balderrama-Carmona, Marcelo Andrés Umsza-Guez, et Bruna Aparecida Souza Machado. 2020. « Antiviral Effects of Brazilian Green and Red Propolis Extracts on Enterovirus Surrogates ». *Environmental Science and Pollution Research International* 27(23): 28510-17.
- ❖ Simon, M. et al. 2000. « Antihemolytic Effect of Rooibos Tea (*Aspalathus Linearis*) on Red Blood Cells of Japanese Quails ». *General Physiology and Biophysics* 19(4): 365-71.
- ❖ Singleton, V. L., et Joseph A. Rossi. 1965. « Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents ». *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-58.
- ❖ Skinner, W. A., H. L. Johnson, M. Ellis, et R. M. Parkhurst. 1971. « Relationship between Antioxidant and Antihemolytic Activities of Vitamin E Derivatives in Vitro ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60(4): 643-45.
- ❖ Sobočanec, Sandra et al. 2006. « Oxidant/Antioxidant Properties of Croatian Native Propolis ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(21): 8018-26.

- ❖ Söhretoğlu, Didem et al. 2016. « Phytochemical Content, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Sedum Spurium* ». *Natural Product Communications* 11(11): 1693-96.
- ❖ Soltani, EL-Khamsa et al. 2017. « Algerian Propolis Extracts: Chemical Composition, Bactericidal Activity and in Vitro Effects on Gilthead Seabream Innate Immune Responses ». *Fish & Shellfish Immunology* 62: 57-67.
- ❖ Surface, F. M., et G. C. Routt. 1913. « Studies on the Complementary and Antihemolytic Properties of Normal Sheep Serum ». *The Journal of Medical Research* 28(3): 441-63.
- ❖ Suwalsky, Mario, José Duguet, et Hernán Speisky. 2017. « An In Vitro Study of the Antioxidant and Antihemolytic Properties of *Buddleja Globosa* (Matico) ». *The Journal of Membrane Biology* 250(3): 239-48.

❖ T

- ❖ Tabbara, Imad.A. 1992. « Hemolytic Anemias. Diagnosis and Management. » *The Medical Clinics of North America* 76(3): 649-68.
- ❖ Tyler, D. B. 1950. « The Hemolytic and Antihemolytic Activities of Various Centrifugally Separated Fractions of Adult and Fetal Liver Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 112(2912): 456-59.
- ❖ Tyler, D. B. 1951. « Hemolytic and Antihemolytic Substances in Guinea Pig Liver ». *Science (New York, N.Y.)* 114(2965): 447-48.

❖ U

- ❖ Ukab, W. A., J. Sato, Y. M. Wang, et J. van Eys. 1981. « Xylitol Mediated Amelioration of Acetylphenylhydrazine-Induced Hemolysis in Rabbits ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 30(11): 1053-59.

❖ V

- ❖ Valensi, F. 2005. « Morphologie des cellules sanguines normales ». *EMC - Hématologie* 2(1): 1-13.
- ❖ Van Rhee, James A. 2019. « Hemolytic Anemia: Mass Destruction ». *Physician Assistant Clinics* 4(3): 649-62.
- ❖ Vishniakov, S. I. 1959. « Anti-hemolytic effects of zinc salts ». *Biokhimiia (Moscow, Russia)* 24(2): 307-10.

❖ W

- ❖ W, Liao et al. 2016. « Protective Effects of Kaempferol against Reactive Oxygen Species-Induced Hemolysis and Its Antiproliferative Activity on Human Cancer Cells ». *European journal of medicinal chemistry* 114.
- ❖ Wang, K., Hu, L., Jin, X.-L., Ma, Q.-X., Marcucci, M.C., Netto, A.A.L., Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, Huang, S., Ren, W.-K., Conlon, M.A., Topping, D.L., Hu, F.-L. 2015. « Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF-κB » *J. Funct. Foods* 19: 464-478.
- ❖ Whelihan, Matthew F., et Kenneth G. Mann. 2013. « The Role of the Red Cell Membrane in Thrombin Generation ». *Thrombosis Research* 131(5): 377-82.
- ❖ Williams, Robert J., Jeremy PE Spencer, et Catherine Rice-Evans. 2004. « Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? » *Free radical biology and medicine* 36(7): 838-849.

❖ **Z**

- ❖ Zeitoun, Rawan et al. 2019. « Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Evaluation of the Lebanese Propolis Extract ». *Current Pharmaceutical Biotechnology* 20(1): 84-96.
- ❖ Zinebi, Eddou Hicham, Mohamed Moudden Karim, et Elbaaj Mohamed. 2017. « Etiological profile of anemia in a department of internal medicine ». *Pan African Medical Journal*: 8.
- ❖ Zinsser, H., et W. C. Johnson. 1911. « on heat-sensitive anticomplementary bodies in human blood serum ». *The Journal of Experimental Medicine* 13(1): 31-42.