

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Bennia Yakout

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Sciences Alimentaires

Spécialité: Nutrition et pathologie

THÈME

**Exploration des Propriétés Biologiques des
Biopeptides et de L'hémolymphe *d'Helix
aspersa* (Müller)**

Soutenue publiquement le 02/07/2023

DEVANT LE JURY

Président	M. Chaalel Abdelmalek	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. YAHLA Imène	MCB	U. Mostaganem
Examineurs	Mr. Bouziane Nabil	MAA	U. Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS.)

Remerciement

Tout d'abord, je remercie Allah Tout-Puissant de m'avoir donné le courage et la patience d'endurer tout ce que j'ai traversé pour en arriver là. Dieu merci quand même
En premier lieu, je voudrais remercier chaleureusement madame **YAHLA IMÈNE** Maître de conférences A à l'Université de Mostaganem, Je lui suis très reconnaissante pour son sérieux dans le travail, que j'ai eu l'opportunité de faire ce travail,

Je lui en suis infiniment reconnaissante.

Je tiens à remercier les membres du jury **Mr. Chaalel Abdelmalek** et **Mr Bouziane**

Nabil d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Je tiens à remercier notre directeur de laboratoire LMBAFS, le Pr RIAZI Ali, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon mémoire dans sans laboratoire.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui ont été impliqués directement ou indirectement dans la réalisation de ce travail de recherche.

Dédicace

Pour dire Dieu Tout-Puissant

ولاتنسوا الفضل بئناكم

Je dédie cet humble acte.

aux parents,

À mon cher père, qui était fatigué jusqu'à ce que j'en arrive là, et qui a vécu ce moment,

A ma précieuse mère, qui a toujours été ma force, et mon canot de sauvetage de tout ce qui me blesse.

À mes frères Ibrahim, Hamza et ma sœur Jasmine

À ma tante Djamila

Si ce n'était de son soutien un jour, je ne serais pas ici, Dieu la bénisse.

*A mes chers amis, qui m'ont aidé dans le laboratoire, Iman Ben Ahmed, Iman Muslim,
Safiya Hamdi Sharif, Itab Hamidi.*

Tous mes remerciements et tout mon respect vont à Mme Hamid Jahra, qui m'a tellement aidé au laboratoire et qui n'a rien lésiné.

Résumé

L'objectif du présent travail est l'étude des activités biologiques de l'hémolymphe et des peptides bioactifs de l'escargot *Helix aspersa*. L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de microdilution et les résultats ont montré que le peptide a une activité antibactérienne avec une CMI=50µl/mL. L'activité antioxydante a été évaluée par le test de piégeage du radical DPPH. Selon les résultats, l'hémolymphe et les peptides présentent un effet antioxydant de 25,5% et 35% respectivement, vis-à-vis de ce radical. L'activité anti-inflammatoire a été explorée par deux méthodes : la méthode de stabilisation des membranes des globules rouges HRBC et le test d'inhibition de la dénaturation des protéines. Les résultats obtenus montrent que l'hémolymphe et les peptides affichent un effet sur la stabilité des membranes des globules rouges de 89% et 91% respectivement. En outre, ils exercent un pouvoir inhibiteur de la dénaturation des protéines de 14,28% et 20,35% respectivement. À partir de ces résultats, on déduit que l'hémolymphe et les peptides ont un bon potentiel anti-inflammatoire.

Mots clés: *Helix aspersa*, Hémolymphe, Peptides bioactifs, activité anti-bactérienne, activité antioxydante, anti-inflammatoire.

Summary

The objective of our work has been to study the biological activities of the haemolymph and the bioactiveof peptides of the *Helix aspersa*snail. Antibacterial activity was evaluated by the microdeletion method and the results showed that the peptide has an antibacterial activity and the CMI=50µl/mL was found. The antioxidant activity is evaluated by the DPPH trap test. According to the results, hemomph and peptides have a low antioxidant effect towards this radical. The anti-inflammatory activity of the samples was investigated by two methods: the HRBC membrane stabilisation method and the protein denaturation inhibition test. The results obtained show that the haemolymph and peptides showed an effect of the stability of the membranes of the red blood cells of 89% and 91% respectively, In addition, this sample exerts a protein denaturation inhibitor of 14,28% and 20.35% respectively. From these results, we deduce the hemolysis and peptides has a good anti-inflammatory potential.

Keywords: *Helix aspersa*, Hemomph, Peptides, anti-bacterial activity, antioxidant activities, anti-inflammatory.

تلخيص

كان الهدف من عملنا هو دراسة الأنشطة البيولوجية للهيموليمف والبيتيدات الحيوية لبيتيدات حلزون هيليكس أسبيرسا. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من خلال طريقة الحذف الدقيق وأظهرت النتائج أن البيتيد له مضاد بكتيري منخفض للغاية حيث تم العثور على $CMI=50\mu l/ml$. يتم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال اختبار مصيدة DPPH. وفقاً للنتائج، فإن الهيمومب والبيتيدات لهما تأثير منخفض على مضادات الأكسدة تجاه هذا الجذري. تم التحقيق في النشاط المضاد للالتهابات للعينات بطريقتين: طريقة تثبيت غشاء HRBC واختبار تثبيط ثني البروتين. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن الهيموليمف والبيتيدات أظهروا تأثيراً على استقرار أغشية خلايا الدم الحمراء بنسبة 89 91 ضافة إلى ذلك، تمارس هذه العينة مثبطاً لتحويل البروتين بنسبة 14.28 20.35% على التوالي. من هذه النتائج، نستنتج أن انحلال الدم والبيتيدات لديه إمكانات جيدة مضادة للالتهابات.

الكلمات الرئيسية: Helix aspersa Hemomph Peptides، النشاط المضاد للبكتيريا، الأ
مضادات الالتهاب.

Liste des abbreviations

- **ACP:** Peptides anticancéreux
- **AMP:** Peptides antimicrobiens
- **ATCC :** American type culture collection.
- **BHI :** Brain Heart Infusion (Bouillon cœur cerveau).
- **BSA :** Albumine de sérum bovin.
- **CMI :** concentration minimal inhibitrice.
- **DO :** Densitéoptique.
- **DPPH :** 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.
E. coli : *Escherichia coli*
- **IC50:** Concentration d'inhibition
- **H.A :** *Helix aspersa*
- **Hc:** Hémocyanines
- **HRBC:** Homologous Red Blood Cell
- **LMBAFS :** laboratoire des microorganismes bénéfiques des aliments fonctionnels et de la santé
- **MAS:** Modified Alsevier Solution
- **MH :** Mueller Hinton
- **PBS :** tampon phosphate saline

Liste des Figures

N°	Titre	Page
1	<i>Helix aspersa</i> (Photos Personnelles)	4
2	Les compositions de l'hémolymphe de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (Machalowski et Jesionowski, 2021).	8
3	Position géographique de la côte de Mostaganem représentant le site déchantillonnage d'escargot <i>Helix aspersa</i> (Google Maps, 2023).	13
4	Élevage d'escargot <i>Helix aspersa</i> (Photos personnelles).	14
5	Paramètres morphométrique de l'escargot <i>C.asparsum</i> . (a): La longueur totale, (b): Lépaisseur, (c): La hauteur.	15
6	Prélèvement de l'hémolymphe de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	16
7	Extraction des fractions peptidiques à partir de l'hémolymphe de l'escargot <i>C.asparsum</i> , (a): Mesure du pH du plasma, (b): Agitation de plasma dans un bain-marie glacé, (c): fraction peptidique d'hémolymphe.	17
8	Schéma de la réaction de la méthode de Lowry (Fumex, 2019).	18
9	(a): Injection des escargots par <i>E.coli</i> , (b): tube d' <i>Escherichia coli</i>	19
10	Réactivation les souches (Institut Pasteur, 2017).	20
11	Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (Coulombier, 2020).	21
12	Activité anti-inflammatoire de, (a): Hémolymphe, (b): Fraction peptidique et (c): diclofénac.	23
13	Teneur en protéines dans l'hémolymphe et la fraction peptidique dans l'escargot non infectées (), et l'escargot infectées()	24
14	Courbe d'étalonnage de l'albumine d'œuf	29
15	Résultat de la méthode de microdilution de l'hémolymphe et les peptides	29

	de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	
16	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'hémolymphe et les Peptides d'escargot <i>Helix aspersa</i> .	31
17	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	35
18	Activité anti-inflammatoire de l'hémolymphe et des peptides de l'escargot <i>Helix aspersa</i> par hémolyse.	37
19	Activité anti-inflammatoire du diclofénac	38
20	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'hémolymphe, des peptides et du Diclofenac	39

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées.	
2	Concentration de la solutions d'albumine	
3	Paramètres biométriques mesurés de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	28
4	Valeurs de CMI D'activité anti-bactérien de l'hémolymphe et des peptides	32
5	LesvaleursdesIC50deséchantillonstestés	35

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Chapitre 01 : <i>Helix aspersa</i>	
I.1. L'escargot <i>Helix aspersa</i>	03
I.2 Position systématique (Taxonomie) d' <i>Helix aspersa</i>	03
I.3. Composition nutritionnelle de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	04
I.3.1 Viande d'escargot	04
I.3.1.a. Les protéines.....	04
I.3.1.b. Les acides gras	05
I.3.1.c. Les vitamines	05
I.3.1.d. Les minéraux.....	05
I.4 Mucus de l'escargot	05
I.5 L'Hémolymphe	06
I.5.1 Les Hémocyanines	06
I.5.2 Les Hémocytes	08
I.6. Les Peptides Bioactifs	08
I.6.1. Les fonctions physiologiques des peptides bioactifs	09
a. Antimicrobiens.....	09
b. Antioxydants	10
c. Anticancéreux	10
d. Ostéoprotecteur	10
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes	
II.1. Site de prélèvements	12
II.2. Élevage des escargots	12
II.2.1 conditions d'élevage	12
II.2.2 Nourriture.....	12
II.2.3 Entretien de l'élevage des escargots.....	12
II.3. Origine des microorganismes	13
II.4. Choix des milieux de culture et conditions de croissance	13
II.5. Mesure des paramètres morphométriques	13

II.6 Prélèvement de l'hémolymphe.....	14
II.7. Extraction des fractions peptidiques	15
II.8. Dosage des protéines (Méthode de Lowry, 1951)	15
II.8.1 Méthode de Lowry	15
II.8.2 Mode opératoire	16
a) La gamme détalonnage	16
b) Réactif de Lowry	16
c) Réactifs Folin-Ciocalteu	16
d) Dosage des protéines dans les échantillons.....	17
II.9 Stimulation de la production des peptides de l'escargot	17
II.10. Activité antibactérienne de lhémolymphe et la fraction peptidique de <i>Helix aspersa</i>	18
II.10.1 Réactivation et l'inoculum les souches bactériennes	18
II.10.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI)	19
II.11 Activités anti-oxydant	19
II.11.1 Test de DPPH.....	19
II.11.2 Détermination de la concentration inhibitrice IC50.....	20
II.12 Exploration de l'activité anti inflammatoire in vitro.....	20
II.12.1.Méthode stabilisation des membrane HRBC	20
a) Préparation des cellules des globules rouges	20
b) stabilisation de la membrane HRBC	21
II.12.2 Test de linhibition de l'albumine	22

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

III.1. Analyse des paramètres morphométriques	25
III.1.1 Biométrie	25
III.2 Dosage des protéines	25
III.3 Activité antibactérienne de lhémolymphe et la fraction peptidique de <i>Helix aspersa</i>	27
III.3.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	27
III.4 Activité anti-oxydante	30
III.4.1 Test du DPPH	30
III.4.2 Evaluation de IIC50	32
III.5 Activité anti-inflammatoire	33
a) Stabilisation des membranes des globules rouges humains HRBC	33
b) Test de linhibition de l'albumine.....	35
Conclusion.....	38
Références	
Annexe	



Introduction

Introduction

Une alimentation saine est essentielle au développement humain et aux besoins quotidiens de l'organisme. L'un des aliments les plus importants est la viande, riche en protéines de grande valeur et en acides aminés essentiels, en vitamines et en minéraux importants (Pissia et al., 2021).

Les escargots sont l'un des aliments consommés par les humains depuis la préhistoire. La viande d'escargot est très riche en protéines et a une faible teneur en matières grasses(Sudalian et al., 2021), la teneur en protéines allant de 5,8 à 20 %, de protéines, et la teneur en matières grasses ne dépassent pas 2.5%. Les escargots sont également une bonne source d'acides aminés essentiels et non essentiels (Pissia et al., 2021). Et sont une excellente source de minéraux et Vitamines. Le mucus d'escargot est un mélange complexe à plusieurs composants biologiquement actifs ayant une activité antioxydante et antibactérienne.

L'hémolymphe est le fluide corporel analogue au sang, que l'on trouve dans des organismes tels que les mollusques tel que les escargots (Machalowski et Jesionowski, 2021), tel que les escargots, les composants protéique et peptidique de l'hémolymphe des escargots de jardin est pharmacologiquement et médicalement important.

Les peptides bioactifs ont fait l'objet d'une attention scientifique particulière pour leur large champ d'application bioactivités, comprenant principalement des propriétés antioxydantes, antihypertensives, anticancéreuses et antimicrobiennes (Zou et al., 2016). Peptides bioactifs ce sont de petits fragments isolés de protéines qui procurent des bienfaits physiologiques pour la santé (Bhandari et al., 2020).

L'objectif de notre travail consiste à évaluer les activités anti-bactérienne, anti-oxydante et anti inflammatoire de l'hémolymphe et des fractions peptidiques de l'escargot *Helix aspersa* Müller.

Ce mémoire s'articule autour de quatre parties :

Chapitre I:

Une partie théorique qui comprend des généralités sur l'escargot et sa valeur nutritionnelle, l'hémolymphe, les peptide bioactifs et leurs fonctions physiologiques

Chapitre II

Une partie pratique qui montre les protocoles suivis au cours de cette étude et les expérimentations réalisées

Chapitre II

Ce partie consiste à présenter les résultats et sa discussion

Enfin, une conclusion générale qui synthétise les principaux résultats de ce travail.

Chapitre I

Helix aspersa

I.1. L'escargot *Helix aspersa*

Parmi les espèces d'escargots les plus ubiquistes, marron de jardin *Helix aspersa* (Müller, 1774);(**Bairi, 2020**).

L'escargot *Helix aspersa* Müller est un mollusques gastéropode terrestre (**Murgia et al., 2022**), fait partie de l'ordre de stylommatophores (**Salmi, 2018**), Appartenant aux Helicidae famille (**Murgia et al., 2022**), il possède un poumon (ou cavoté palléale), ce qui le situe dans le sous classe de pulmonés (**Bairi, 2020**), il est répandu dans la région du bassin méditerranées et dans le nord-ouest de l'Europe (**Murgia et al., 2022**), et de la façade atlantique française (**Salmi, 2018**).

Cet escargot est aussi connu sous le nom de *cornu aspersum* (**Murgia et al., 2022**), *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersumdans*, il est également connu sous le nom de petit grès (**Ameur, 2021**).

L'*Helix asparsa* est une espèce ubiquiste, très répandue dans le monde, parfois considérée comme envahissante, qui fréquente les zones cultivées, les jardins et les forêts. La durée de vie moyenne en milieu naturel est de 5 ans (**Louzon, 2020**).

Le corps des escargots se compose d'une partie tête-pied qui contient les organes d'alimentation, sensoriels et locomoteurs, et d'une partie de masse viscérale, qui est composée des organes digestifs, circulatoires (**Pissia et al., 2021**), où l'hémolymphe circule dans les interstices des organes de la cavité viscérale (**Bairi, 2020**), organes respiratoires et reproducteurs. Ils ont également un obus lourd, qui leur sert de défense principale (**Pissia et al., 2021**).

I.2 Position systématique (Taxonomie) d'*Helix aspersa*

Règne : Animalia (Linnaeus, 1758)

Embranchement : Mollucsa (Cuvier, 1795)

Classe : Gasteropoda (Cuvier, 1797)

Ordre : Stylommatophora (Schmidt, 1856)

Famille : Helicidae (Rafinesque, 1815)

Genre : *Helix* (Linnaeus, 1758)

Espèce : *Helix aspersa* (Müller, 1774) (**Ameur, 2021**).



Figure 01: *Helix aspersa* (Photos Personnelles)

I.3. Composition nutritionnelle de l'escargot *Helix aspersa*

Les escargots terrestres sont pharmacologiquement et médicalement important, car il riche en protéines qu'il utilisé pour lutter contre différents conditions environnementales (Azeem et al., 2022), et utilisé comme un modèle biologique (Bairi, 2020).

I.3.1 Viande d'escargot

Une alimentation saine est essentielle au développement humain et aux besoins quotidiens de l'organisme. L'un des aliments les plus importants est la viande, riche en protéines de grande valeur et en acides aminés essentiels , en vitamines et en minéraux importants (Pissia et al.,2021).

Les escargots sont l'un des aliments consommés par les humains depuis la préhistoire. La viande d'escargot est très riche en protéines et a une faible teneur en matières grasses (Sudalian et al., 2021), quelle que soit leur origine, ont une teneur en protéines comparable (allant de 10,8 à 25,6%), et la teneur en graisse d'escargot (allant de 0,06 à 8,46 %) (Pissia et al., 2021), et 70% d'eau (Adeyey et al., 2020).

La valeur énergétique de la viande d'escargot est de 67 kcal/100g, bien inférieure à celle de la viande ou du poisson les plus maigres qui fait des escargots un aliment alternatif sain pour les personnes ayant des besoins alimentaires riches en protéines et faibles en gras (Toader-Williams et Golubkina, 2009).

I.3.1.a. Les protéines

Chez *Helix aspersa* la teneur en protéines allant de $12,87 \pm 0,13\%$, et pour les acides aminés non essentiels les plus abondants chez *Helix aspersa* sont l'acide glutamique et l'alanine, avec des concentrations respectives de 1,4 g/100 g de protéines et 1,1 g/100 g de protéines, tandis

que la lysine et la phénylalanine prédominent parmi les acides aminés essentiels, tous deux avec une concentration de 0,7 g/100 g de protéines (Pissia et al., 2021).

I.3.1.b. Les acides gras

La teneur en grasses allant de $0,58 \pm 0,03\%$. Parmi les acides gras saturés, 7,3% d'acide palmitique (16:0), et 17,4% d'acide stéarique (18:0). Tandis que 13,6% d'acide oléique (18:1 n - 9), est le principal acide gras monoinsaturé (Pissia et al., 2021).

Selon Ça iltay et al. (2011), les acides gras polyinsaturés, étaient les acides gras les plus abondants chez l'escargot. Les principaux acides gras polyinsaturés sont l'acide linoléique (18:2 n -6) 17,5% et l'acide eicosadiénoïque (20:2) 7,5%, $2,80 \pm 0,40\%$ d'acide arachidonique (n-6) (Pissia et al., 2021).

L'escargot les espèces contiennent une composition lipidique équilibrée à des fins nutritionnelles (Ça iltay et al., 2011). La teneur en cholestérol de la viande d'escargot est faible, 10mg cholestérol /10g de viandes (Hayes et Mora, 2021).

I.3.1.c. Les vitamines

Les vitamines A, E, B1, B2, B3 et B6 jouent un rôle important dans le métabolisme humain, le système immunitaire et le système digestif. Il est rapporté que le le corps humain a besoin de 1,5 mg de vitamine A, 17 mg de vitamine E, 1,4 mg de vitamine B1, 1,6 mg de vitamine B2, 17 mg de vitamine B3 et 1,9 mg de vitamine B6, tous les jours.

100g de viandes d'escargot contient 5,462 mg de vitamine A, ce qui est suffisant. Il est également à noter que la même quantité de viande d'escargot répondrait aux exigences quantités de vitamines E, B1, B2, B3 et B6. l'escargot de jardin *Helix aspersa* n'est pas différent des autres sources d'aliments pour animaux en termes de teneur en vitamines (Ça iltay et al., 2011).

I.3.1.d. Les minéraux

Les escargots de jardin sont également riches en minéraux. Le calcium a été déterminé le plus élevé chez les escargots terrestres *Helix aspersa* (Ca, 1357mg / kg), suivi du potassium (K 1054 mg / kg), du phosphore (P 967 mg/kg) et de sodium (Na 919 mg / kg). En outre 170 mg / kg de magnésium (Mg) et 5,21mg / kg de fer (Fe), La teneur en minéraux varie selon l'emplacement, les cycles biologiques, la saison et les habitudes alimentaires (Ça iltay et al., 2011).

Il contient également de l'orthophosphate de Calcium, un substrat chimique qui pourrait atténuer et réduire les maladies rénales (Adeyeye et al., 2020).

I.4 Mucus de l'escargot

Pendant des siècles les escargots ont été utilisés comme source de nourriture et pour le traitement des plaies en médecine traditionnelle par simple application du mucus natif (Tancheva et al., 2022).

Et dans un passé récent, les gens mangeaient des escargots vivants pour soulager les brûlures d'estomac : lorsque les escargots atteignent l'estomac, ils produisent du mucus, contrastant l'acidité. Considérant le rôle du mucus d'escargot dans la réparation des ulcères et en réfléchissant au rôle du mucus humain pour prévenir ou combattre l'acidité, il a été développé des sirops contre l'acidité gastrique et le reflux gastrique de l'œsophage (Dolashka et al., 2015).

Le mucus d'escargot *Helix aspersa* est un mélange complexe à plusieurs composants, qui contient un certain nombre de substances bioactives avec différents points moléculaires et propriétés (Tancheva et al., 2022). Cette substance bioactive est sous forme de peptides et de glycopeptides à activité antioxydante et antibactérienne ont été identifiés dans le mucus de l'escargot de jardin *Helix aspersa* (Vassilev et al., 2020).

Selon Tancheva et al. (2022), l'extrait d'escargot *Helix aspersa* a la capacité d'améliorer la mémoire dans le type expérimental d'Alzheimer démence

I.5 L'Hémolymphe

Selon Machalowski et Jesionowski (2021), la première étude de la composition et des fonctions de l'hémolymphe des mollusques a été menée au milieu du XIXe siècle par Leydig, qui a décrit des observations du plasma de l'escargot de rivière *Paludina viviparus* (Montfort, 1810). On lui doit la première description des hémocytes, comme « corpuscules nucléés qui prolongent parfois les pseudopodes et se rassemblent en masses ». Par la suite, d'autres observations importantes ont été rapportées par Fredericq, qui a découvert l'hémocyanine des mollusques, et Cuénot, qui a donné une caractérisation de l'hémolymphe et des hémocytes.

L'hémolymphe est le fluide corporel analogue au sang, que l'on trouve dans des organismes tels que les mollusques, les insectes... ect, ce mélange complexe contient divers composants biochimiquement et pharmacologiquement actifs, est reconnue comme une source potentielle de biomacromolécules (peptides) à activité antimicrobienne, antivirale, antifongiques et anticancéreux (Machalowski et Jesionowski, 2021).

L'hémolymphe des escargots contient des composés bioactifs sous forme de glycanes, peptides, glycopeptides et protéines (Aleksova et al., 2021).

Selon Machalowski et Jesionowski (2021), l'hémolymphe des mollusques est l'un des trois principales composantes de la source de calcium avec les branchies et le manteau.

La fonction principale de l'hémolymphe, qui existe dans un système circulatoire ouvert, est le transport de l'oxygène, des métabolites et d'autres composants essentiels à la vie des mollusques. Il est composé principalement d'eau, mais aussi des sels inorganiques et des composés organiques, principalement des glucides, des protéines, des lipides, des enzymes, des agents respiratoires (hémocyanine) et des cellules en suspension libres appelées hémocytes (Machalowski et Jesionowski, 2021).

Les escargots terrestres sont exposés à des cycles annuels d'activité et de dormance en relation avec les changements saisonniers des paramètres environnementaux, tels que la température ou l'humidité. Les paramètres biochimiques et la composition de l'hémolymphe des mollusques sont étroitement liés à de nombreux facteurs, notamment les espèces donneuses, l'état physiologique de l'animal, la disponibilité de la nourriture (les sources alimentaires changeant selon les saisons sont liées à la variation des métabolites de l'hémolphe), la photopériode et l'état de santé (Machalowski et Jesionowski, 2021).

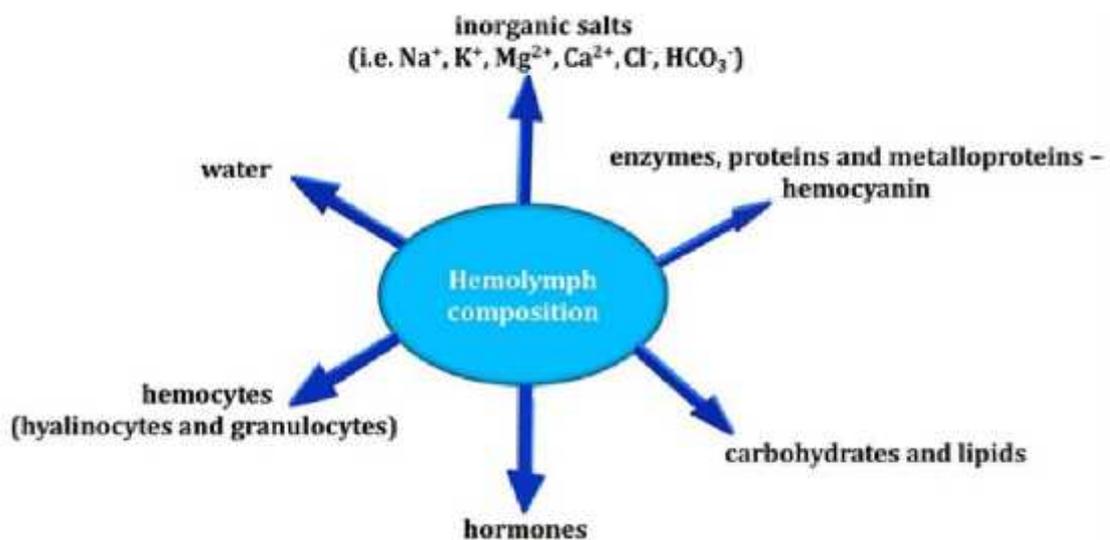


Figure 02 : les compositions de l'hémolymphe de l'escargot *Helix aspersa* (Machalowski et Jesionowski, 2021).

I.5.1 Les Hémocyanines

Les hémocyanines sont des glycoprotéines transportant l'oxygène dans l'hémolymphe des arthropodes et des mollusques qui suscitent l'intérêt scientifique avec leurs diverses activités biologiques et leurs applications potentielles en pharmacie et en médecine (**Georgieva et al., 2020**).

L'hémolymphe des escargots de jardin *Helix aspersa* fournit des hémocyanins (Hc) (**Vassilev et al., 2020**), C'est la principale protéines, représente jusqu'à 90% des propriétés de l'hémolymphe (**Machalowski et Jesionowski, 2021**), qui effectuent la même fonction que l'hémoglobine, à savoir, pour transporter l'oxygène à toutes les cellules du corps (**Vassilev et al., 2020**). Outre le transport de l'oxygène, les Hc sont également connus pour participer à divers processus physiologiques, tels que le transport hormonal, l'osmorégulation, l'hémostase, le stockage d'énergie, la mue et la formation d'exosquelette (**Georgieva et al., 2023**).

L'Hc est une protéines de liaison au cuivre de type 3 et devient bleue lors de la liaison de l'oxygène au site actifs (**Machalowski et Jesionowski, 2021**), et est incolore sous sa forme désoxydée (**Ameur, 2021**).

L'hémocyanine et leur sous-unité structurelle de l'hémocyanine de *Helix aspersa* Muller ont diminué la viabilité des cellules cancéreuses de la vessie. De plus, l'hémocyanine isolée de *Helix aspersa* Muller a diminué la viabilité des cellules cancéreuses de l'ovaire, des cellules cancéreuses de la prostate, des cellules de leucémie monocyttaire aiguë, des cellules de lymphome de Burkitt et des cellules cancéreuses de gliome (**Matusiewicz et al., 2018**).

Les hémocyanines ont une activité immunostimulante, grâce aux propriétés structurelles, elles stimulent le système immunitaire de manière non spécifique, elles interagissent avec les macrophages, les granulocytes, les cellules CD4+ et CD8+, induisent de puissantes réponses immunitaires cellulaires et humorales (**Matusiewicz et al., 2022**).

I.5.2 Les Hémocytes

Les hémocytes, (également appelés amebocytes ou hémocytes) sont des cellules hémolytiques multifonctionnelles, est un composant de l'hémolymphe des mollusques, responsables de nombreux aspects de la vie des mollusques, y compris la biominéralisation, la formation de la coquille et les processus de régénération (**Machalowski et Jesionowski, 2021**).

Des fonction immunitaire ont été mises en évidence dans les hémocytes des gastéropodes pulmonés terrestres incluant des activités phagocytaires est enzymatique diverse (**Louzon, 2020**).

I.6 Les Peptides Bioactifs

Les peptides bioactifs sont de petits fragments isolés de protéines qui procurent des bienfaits physiologiques pour la santé. Ils agissent comme des modificateurs potentiels réduisant le risque de nombreuses maladies chroniques, lorsqu'ils sont consommés, ont une influence positive sur la santé en agissant comme source de nutrition et démontrent de nombreuses fonctions physiologiques potentielles dans le corps (**Bhandari et al., 2020**).

Les peptides bioactifs c'est une objet d'une attention scientifique particulière pour leur large éventail de bioactivités, comprenant principalement des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (**Abrashev et al., 2018**), contre un large éventail de bactéries gram-positives par exemple *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Propionibacterium acnes*, et gram-négatives tels que *E. coli*, *Helicobacter pylori* (**Dolashki et al., 2018; Dolashki et al., 2020**).

Ces peptides sont particulièrement importants pour leurs contributions notables à l'amélioration de la santé humaine grâce à l'élimination des radicaux libres dangereux. De plus, ils se sont révélés être de bons candidats pour le développement d'agents antimicrobiens alternatifs (**Abrashev et al., 2018**).

Les peptides bioactifs comprennent la séquence d'acides aminés, qui sont présents sous une forme inactive et peuvent être produits à partir de protéines précurseurs par deux méthodes différentes : l'hydrolyse enzymatique et la fermentation.

Les sources alimentaires naturelles contenant ces peptides bioactifs peuvent considérablement aider à prévenir les maladies (**Bhandari et al., 2020**).

I.6.1. Les fonctions physiologiques des peptides bioactifs

a. Antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMP) sont les peptides de défense de l'hôte, la plupart d'entre eux étant des molécules peptidiques cationiques (chargées positivement) et amphiphiles (hydrophiles et hydrophobes), Les AMP sont omniprésents dans la nature. Ils existent dans divers organismes, y compris les bactéries, les champignons, les animaux et les plantes, et dans toutes les autres espèces de mammifères (**Lei et al., 2019**).

La perméabilité membranaire est principalement reconnue comme le mécanisme bien accepté pour décrire l'action des AMP cationiques. Ces AMP cationiques peuvent se lier et interagir avec les membranes cellulaires bactériennes chargées négativement, entraînant une modification du potentiel électrochimique sur les membranes cellulaires bactériennes, induisant des dommages aux membranes cellulaires et la perméation de molécules plus grosses telles que

les protéines, détruisant la morphologie et les membranes cellulaires et entraînant finalement la mort cellulaire. Les molécules peptidiques amphiphiles sont des hélices avec des moitiés hydrophobes et hydrophiles et affichent leur amphiphilie tout en interagissant avec les membranes cellulaires bactériennes (**Lei et al., 2019**).

b. Antioxydants

Les peptides antioxydants sont particulièrement importants pour leurs contributions notables à la santé humaine améliorée par la prévention et le traitement des maladies dégénératives chroniques non transmissibles, telles que les maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires, le cancer, la polyarthrite rhumatoïde ou le diabète. De plus, les peptides aux propriétés antioxydantes exercent des ions métalliques efficaces (Fe^{2+} / Cu^{2+}) une activité chélatrice et une capacité inhibitrice de la peroxydation des lipides, ce qui leur confère des propriétés potentielles en tant qu'additifs de transformation alimentaire (**Zou et al., 2016**).

c. Anticancéreux

Anticancéreux implique le traitement ou l'utilisation de peptides dans la prévention du cancer ou des tumeurs malignes (multiplication incontrôlée des cellules) (Bhandari et al., 2019). Les peptides anticancéreux (ACP) n'altèrent pas les fonctions physiologiques normales de l'organisme, ils ouvrent des perspectives prometteuses pour le traitement du cancer. Les ACP présentent des avantages uniques et exceptionnels. En effet, les ACP sont des produits biologiques naturels et sont donc plus sûrs que les drogues synthétiques, ainsi qu'une efficacité, une sélectivité et une spécificité supérieures (**Chen et al., 2016**).

d. Ostéoprotecteur

Ostéoprotecteur signifie littéralement protection des os, c'est-à-dire les peptides aidant à la protection des os de notre corps. Pour guérir l'ostéoporose dans notre corps, nous avons besoin d'un apport plus élevé de calcium dans notre alimentation qui est biodisponible. On constate que dans les composants du lait, les peptides antioxydants dérivés du lactosérum (YVEL) ont montré une activité ostéoprotectrice plus importante (**Bhandari et al., 2020**).

CHAPITRE II :

Matériel et Méthodes

II.1. Site de prélèvements

L'escargot a été acheté au marché couvert, de la wilaya de Mostaganem le 05/03/2023.

Le travail a été réalisé au laboratoire des micro-organismes bénéfiques des aliments fonctionnels et de la santé de l'Université AbdulHamid Ibn Badis de Mostaganem.



Figure03: Position géographique de la côte de Mostaganem représentant le site d'échantillonnage d'escargot *Helix aspersa* (Google Maps, 2023).

II.2. Élevage des escargots

II.2.1 conditions d'élevage

Conditions naturelles de l'environnement du laboratoire (T°, la lumière, humidité, et les couvercles des boîtes sont percés pour laération).

II.2.2 Nourriture

Les escargots sont nourris par la semoule et la salade, et également pourvue d'eau.

II.2.3 Entretien de l'élevage des escargots

Les boîtes en plastique sont lavées et les matières fécales enlevées. La nourriture et l'eau sont renouvelées. Le nettoyage et entretien sont effectués deux deux fois / semaine (figure 4).



Figure04:Élevage d'escargot *Helix aspersa* (Photos personnelles).

II.3. Origine des microorganismes

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Salmonella typhimurium* ATCC 6539, utilisées lors de la présente étude proviennent de la collection du Laboratoire de Microorganisme bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la santé, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

II.4. Choix des milieux de culture et conditions de croissance

La mise en culture des bactéries pathogènes nécessite un milieu liquide « Bouillon cœur cervelle » BHI, utilisé comme milieu d'enrichissement.

Pour le dénombrement, il est réalisé sur milieux solides Mueller Hinton. (Tableau. 1).

Les souches pathogènes sont des bactéries anaérobies facultatives. Leur incubation se fait à 37°C en aérobiose sur milieu solide ou liquide.

Tableau01: Origin ,milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisée.

Souches	Origine de la souche	Milieu de culture	Température de croissance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LMBAFS	BHI(Réf.Cat14000,Laboratoire CondaS.A,Spain)	37°C
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 6539	LMBAFS	BHI(Réf.Cat14000,Laboratoire CondaS.A,Spain)	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	LMBAFS	BHI(Réf.Cat14000,Laboratoire CondaS.A,Spain)	37°C

II.5.Mesure des paramètres morphométriques

Après le nettoyage de l'escargot, les paramètres morphométriques sont mesurés à l'aide un pied à coulisse de précision 0-150mm (Zaafouretal.,2014).

Les paramètres mesurés sont (figure5):

La longueur totale (L:prise suivant l'axe antéro-postérieur);

La hauteur (h:distance maximale suivant l'axedorsa-ventral);

L'épaisseur (l:est la largeur maximale de la convexité des 2 valvesréunies).

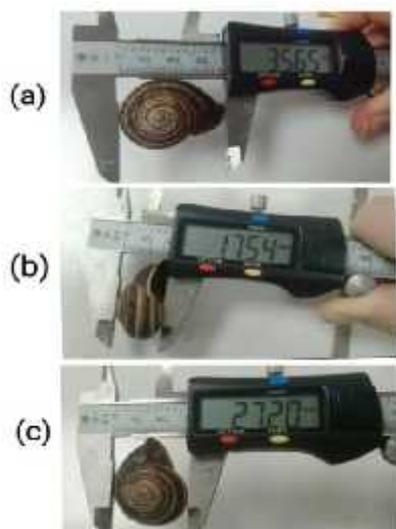


Figure 05: Paramètres morphométrique de l'escargot *C. asparsum*.

(a) : La longueur totale, (b): L'épaisseur, (c): Lahauteur.

II.6 Prélèvementdel'hémolymphhe

La méthode de prélèvement de l'hémolymphhe qui a été appliquée consiste à piquer l'escargot à l'aide d'une aiguille et à collecter l'hémolymphhe dans des tubes stériles (figure 6). En présence de 1 volume de tampon anti-agrégant MAS (Modified Alsevier Solution (est utilisé comme anticoagulant, qui est également empêche la lyse cellulaire): 27 mM Na-citrate, 336 mM NaCl, 115 mM glucose, 9 mM EDTA, pH 7.0), et centrifugé (ZENTRIFUGEN, ROTOFIX 32 A) immédiatement à 800g pendant 15 min à 4°C (Tasiemski et al., 2007).

Le surnageant, correspondant à la fraction plasmatique, est additionné d'aprotinine (5µg/ml) et congelé (-80°C) jusqu'à utilisation (Mitta et al., 1999).

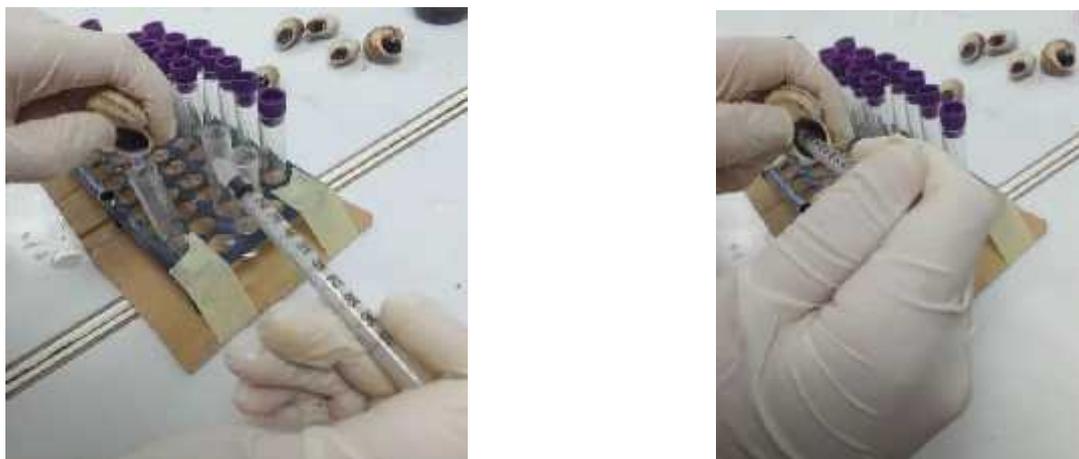


Figure06:Prélèvementdel'hémolymphhedel'escargot*Helixasparsa*

II.7. Extraction des fractions peptidiques

Le plasma est dilué (1:1 v/v) dans l'eau ultra pure (stérilisée par ultrafiltration MilliQ) contenant 0.1% d'acide trichloracétique, Ou eau distillée. Le pH est amené à 3,9 par HCl de 1M, sous agitation dans un bain-marie glacé pendant 30 min. Après centrifugation (ZENTRIFUGEN, ROTOFIX 32 A)(10000g, 20 min, 4°C) le surnageant est recueilli et maintenu à 4°C jusqu'à utilisation (Mitta et al., 1999).

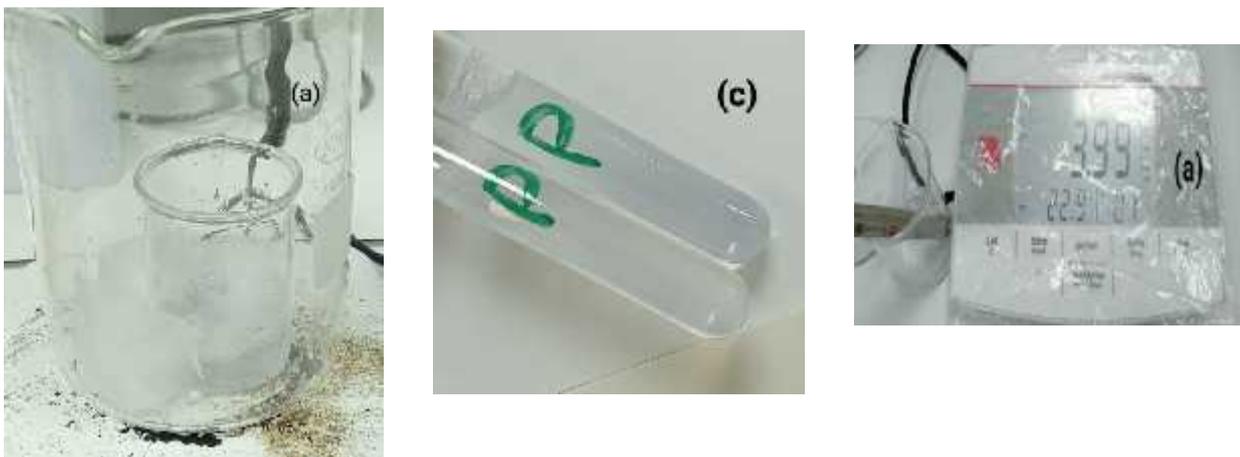


Figure07: Extraction des fractions peptidiques à partir de l'hémolymphe de l'escargot *C.asparsum*,(a): Mesure du pH du plasma,(b):Agitation de plasma dans un bain-marie glacé,(c):fraction peptidique d'hémolymphe.

II.8. Dosage des protéines (Méthode de Lowry, 1951)

8.1 Méthode de Lowry

La méthode de Lowry pour le dosage des protéines totales a été mise au point en 1951 par Oliver H. Lowry (Fumex, 2019).

La méthode de Lowry consiste en une amélioration de la réaction du Biuret par ajout d'une étape supplémentaire. Dans un premier temps, l'échantillon contenant les protéines à doser est traité avec le réactif de Gornall, afin de créer un complexe cuivrique en milieu alcalin. Dans un deuxième temps, un second réactif de nature phosphomolybdique-phosphotungstique est utilisé et appelé réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est réduit par les complexes cuivre-protéines,

ce qui entraîne l'apparition d'une coloration bleu foncé, dont l'absorbance peut être mesurée à 750 nm (figure 08) (Fumex, 2019).

Le réactif Folin-Ciocalteu réagit avec les groupements tyrosines et tryptophanes pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle de biuret, et qui est proportionnelle à la quantité de protéines de l'échantillon (Méthode de Lowry et al., 1951).

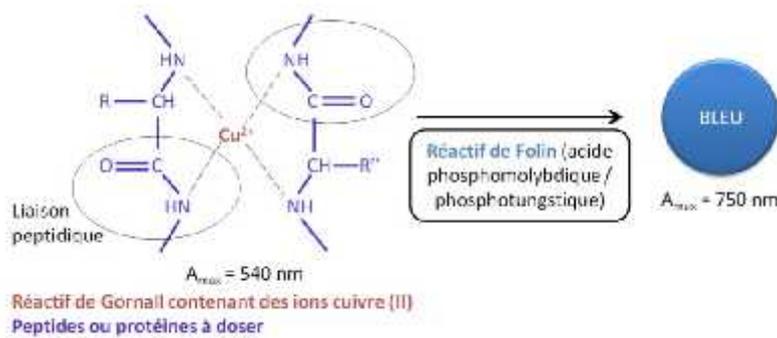


Figure 08: Schéma de la réaction de la méthode de Lowry (Fumex, 2019).

8.2 Mode opératoire

a) La gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est effectuée avec une solution d'albumine préparée à 25 mg par 100 ml d'eau distillée.

b) Réactif de Lowry

Solution A (solution alcaline): est un mélange de 2,85g de soude (NaOH), et de 14,3g de carbonate de sodium (Na₂CO₃), dans 500 ml d'eau distillée.

Solution B: est constituée d'1,42g de sulfate de cuivre (CuSO₄), dans 100 ml d'eau distillée.

Solution C: Constituée de 2,85g de tartrate de sodium dihydrate (C₄H₄Na₂O₆.2(H₂O)), dans 100ml d'eau distillée.

Solution de Lowry: SA+SB+SC => 100:1:1 (V/V) à mélanger au moment de la manipulation.

c) Réactifs Folin-Ciocalteu

5ml de Réactifs Folin-Ciocalteu sont mélangés avec 5mL d'eau distillée (v/v).

Tableau02: Concentration des solutions d'albumine

Concentration µg/ml	0	20	40	60	80	100
Albumine(mg/ml)	0	10µl	30µl	40µl	50µl	60µl
Eau	500µl	490µl	480µl	470µl	460µl	450µl
Solutiondelowry	5mL	5mL	5mL	5mL	5mL	5mL
RéactifsFolin- Ciocalteu	0,5mL	0,5mL	0,5mL	0,5mL	0,5mL	0,5mL

d) Dosage des protéines les échantillons

- 1- Filtration de 1 ml d'échantillons (hémolymphe et peptides, séparément), avec 25 ml d'eau physiologique ;
- 2 - On prend de ce filtrat 1ml et on le rajoute à 100 ml deau distillée (Solution mère);
- 3 - 1 ml est prélevé de la solution mère et mis dans des tubes à essai ;
- 4 - 5 ml de réactif Lowry sont ajoutés puis laissés reposer pendant 10 min;
- 5 - 0,5 ml de Folin dilué à moitié, est ajouté dans chaque tube;
- 6 - Agiter les tubes à laide dun Vortex pendant 2min, Ils sont ensuite incubés pendant 30min dans l'obscurité et à température ambiante ;
- 7 - La lecture se fait au spectrophotomètre (DLAB, SP-UV1100) à une longueur donde de 750nm.

Les densités optiques ainsi obtenues sont convertie en pourcentage de protéines grâce à une courbe détalonnage préparée dans les mêmes conditions.

Calcul delaconcentrationenprotéines

C:concentration en protéines

X:Concentration de l'échantillon en abscisse

$$C=X.25/\text{poids de l'échantillon} /100$$

II.9 Stimulation de la production des peptides de l'escargot

A find 'augmenter la production des peptides de l'escargot, 100µld *E.Coli*en suspension de charge de 10^8 UFC/ml préalablement traitée par la chaleur (121°C pendant M20min) sont

injectés dans la cavité palléale (figure9). Et l'hémolymphe a été prélevé après 2 jours. Les protéines sont en suite dosées par la méthode de Lowry.



Figure 09: (a):Injection d'escargots par *E.coli*, (b): tube d'*Escherichia coli*

II.10. Activité antibactérienne de l'hémolymphe et la fraction peptidique de *Helix aspersa*

II.10.1 Réactivation et l'inoculum les souches bactériennes

100 μ l de chaque souche ont été inoculés dans 10mL de bouillon nutritif (figure10). Après 24h d'incubation à 37°C, les inoculums ont été ajoutés à 0,5MC Ferland (UFC/mL) soit à un D.O qui s'étend de 0.08 à 0.10 à 620nm.

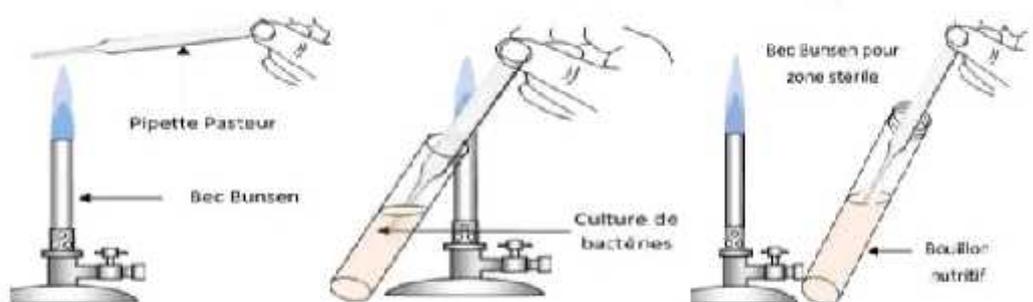


Figure10:Réactivation les souches (InstitutPasteur,2017).

II.10.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI)

La Concentrations minimales inhibitrices (CMI),est définie comme étant la plus faible concentration en hémolymphe ou peptides capable d'inhiber la croissance microbienne de 90% (Skandamis et Nychas, 2001), est déterminée par la méthode de microdilution.

200µL d'échantillons sont placés dans le premier puits (hémolymphe et peptides, chacun séparément). Et dans le reste des puits,100µL de bouillon nutritif sont placés. À partir du premier puits, une dilution séquentielle a été effectuée jusqu'à l'avant-dernier puits. Le dernier puits est utilisé comme témoin (bactéries+bouillon nutritif). 1ml de bouillon a été mélangé à 100µL de suspension bactérienne (Debalke et al., 2018).

La suspension bactérienne cultivée en phase logarithmique a été diluée à 0,5 Mcfarland Standard (environ $1,5 \times 10^8$ UFC/mL)(Aleksova et al., 2021),

Après cela, 100µL du mélange (bactéries+bouillon nutritif) ont été ajoutés à tous les puits jusqu'à ce que le témoin. Par la suite, les microplaques ont été incubé pendant 24h à l'incubateur 37°C (Debalke et al., 2018).

La lecture des résultats est effectuée après 24h d'incubation. La plus faible concentration qui a totalement inhibée le germe étudié est considérée comme la CMI.

II.11 Activités anti-oxydant

II.11.1 Test de DPPH

L'hémolymphe et les fractions peptidiques ont été évalués pour la capacité de don d'électrons (ou d'atomes d'hydrogène) en utilisant le niveau de blanchiment d'une solution de couleur pourpre de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle–DPPH)- un radical stable utilisé comme réactif (Kostadinova et al., 2018).

.Le DPPH est un radical artificiel stable de couleur violette qui devient jaune pâle lorsqu'il est réduit par un antioxydant, qui a été initialement développée par Blois (1958) (figure11). Cette décoloration est suivie par une mesure d'absorbance à 517nm (Coulombier, 2020; Ismaili et al., 2017).

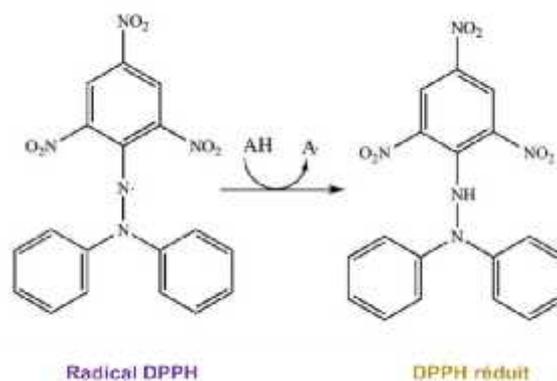


Figure 11: Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydante (Coulombier,2020).

Un volume de 0,5ml de chacun des deux échantillons a été ajouté à 1ml de DPPH (100 μ M) dans l'éthanol. L'absorbance a été lue dans l'appareil spectrophotométrique (DLAB,SP-UV1100) contre un blanc à 517nm, après 30min de période d'incubation à 37°C (Kostadinova et al., 2018). La procédure a été suivie de la même manière pour l'acide ascorbique (antioxydant de référence)

L'inhibition de la DPPH radicalaire en pourcentage a été calculée selon la formule:

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs controle} - \text{Abs test}) \times 100 / \text{Abs controle}$$

Où:

Abs contrôle : Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 517nm;

Abs test : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517nm.

II.11.2 Détermination de la concentration inhibitrice IC50

La IC50 exprime la quantité d'antioxydant requise pour réduire de 50% la concentration du radical libre. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé. En effet, plus la valeur de IC50 est basse, plus l'activité antioxydante est grande (Dung et al., 2008).

II.12 Exploration de l'activité anti inflammatoire in vitro

II.12.1.Méthode stabilisation des membrane HRBC

a) Préparation des cellules des globules rouges

L'activité anti-inflammatoire a été déterminée à l'aide d'un test de stabilisation membranaire des globules rouges humains (HRBC), selon (León et al., 2018) avec quelques modifications.

Le diclofénac, a été utilisé comme médicament de référence et traité de la même manière pour la détermination de l'absorbance (**Chandra et al., 2012**).

Du sang humain veineux a été prélevé sur une femme adulte normale qui n'avait pas consommé de médicaments anti-inflammatoires ou contraceptifs pendant deux semaines avant de prélever l'échantillon.

Le sang recueilli a été mélangé avec un volume égal de solution d'alsever (2% dextrose; 0.8% Citrate de sodium; 0.05% Acide citrique et 0.42% chlorure de sodium)

La mixture a été centrifugée (Zentrifugen, Rotofix 32 A) à 3000 tr/min pendant 10min et les concentrés de cellules ont été utilisés directement.

b) stabilisation de la membrane HRBC

Le principe en jeu ici est la stabilisation de la lyse de la membrane HRBC induite par une hypotonie (figure 12). Le mélange d'essai contenait l'échantillon (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml). Diclofénac - médicament standard à base de sodium- (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml). 1 ml de tampon phosphaté (0,15 M, pH 7,4). 2 ml d'hyposaline (0,36 %). 0,5 ml de HRBC. Ont été incubés à 37 °C pendant 30 min et centrifugés pendant 20 min à 3 000 tr/min. La teneur en hémoglobine de la suspension a été estimée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (DLAB, SP-UV1100).

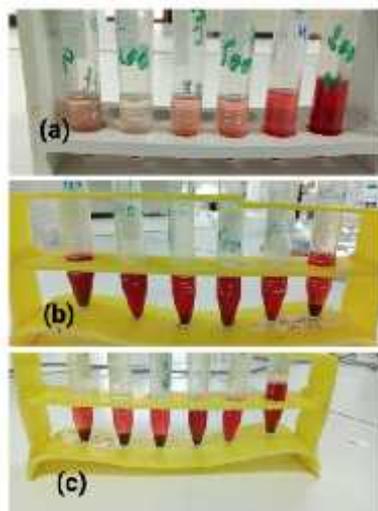


Figure12: Activité anti-inflammatoire de, (a): Hémolymphe, (b): Fraction peptidique et, (c): diclofénac.

II.12.2 Test de l'inhibition de l'albumine

L'activité anti-inflammatoire in vitro a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La méthode consiste à préparer trois solutions.

La solution d'échantillon : (0.5ml) composée de 0.45 ml de la solution d'albumine d'œuf et 0.05ml de l'échantillon.

La solution standard : (0.5ml) composée de 0.45ml de la solution d'albumine d'œuf et 0.05mL de solution de standards diclofénac sodium avec une concentration de 100mg.

La solution témoin : (0.5ml) composée de 0.45 ml de la solution d'albumine d'œuf et 0.05 ml d'eau distillé.

Toutes les activités solutions ont été ajustées à une pH= 6.3, par une solution de HCL (1N). Les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 20min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2.5 ml de la solution tampon phosphate saline (PBS) à (pH= 6.3) ont été ajoutés aux solutions préparées.

L'absorbance a été lue par le spectrophotomètre (DLAB, SP-UV1100) à 660 nm. Le pourcentage de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{D.O de l'échantillon} - \text{D.O du témoin} / \text{D.O du témoin} \times 100$$

D.O de l'échantillon: densité optique de l'échantillon;

D.O du témoin: densité optique du témoin.

CHAPITRE III :

Résultats et Discussion

III.1. Analyse des paramètres morphométriques

III.1.1 Biométrie

Les mesures des paramètres biométriques de l'escargot *Helix aspersa* acheté au Marché couvert de Mostaganem sont représentés sur le tableau 03.

Tableau 03: Paramètres biométriques mesurés de l'escargot *Helix aspersa*

Paramètres biométriques	Valeurs de mesure
Longeur(L)	A 31,91mm de 35,65mm
Hauteur(H)	A 25,26mm de 27,21mm
Épaisseur(E)	A 16,71m de 18,68mm

Il a été montré que le facteur âge affecte les trois paramètres biométrique (longeur, hauteur, épaisseur). Plus l'escargot est âgé, la longeur, la hauteur et l'épaisseur de sa coquille augmentent.

III.2 Dosage des protéines

Afin de déterminer la teneur en protéines de l'hémolymphe et des fonctions peptidiques (infectées par E.coli et non infectées) de l'escargot *Helix aspersa* Müller, la méthode de Lowry a été appliquée.

Les résultats relatifs à le dosage des protéines sont illustrés dans la figure 13 ,et la courbe d'étalonnage d'albumine dans la figure 13.

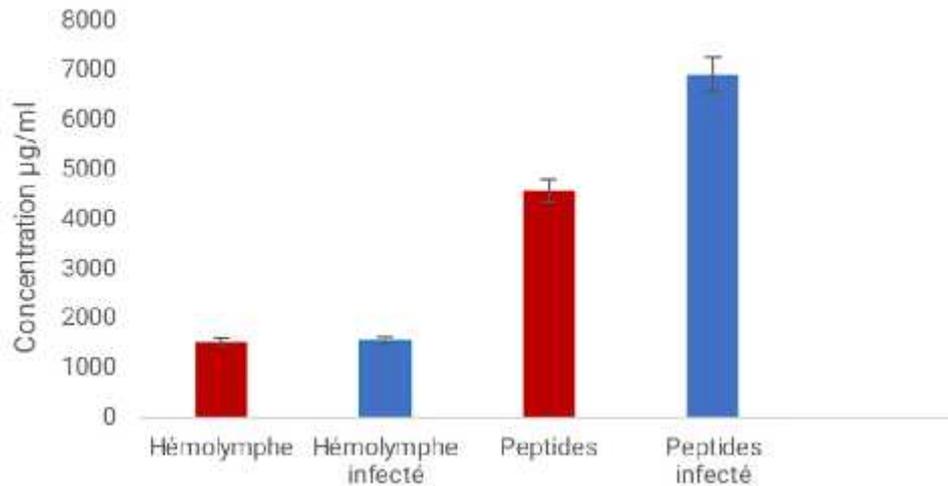


Figure 13: Teneur en protéines dans l’hémolymphe et la fraction peptidique dans l’escargot non infectées (), et l’escargot infectées()

Les résultats obtenus montrent que la concentration des protéines augmente après l’injection d’E.coli.

La concentration de protéines dans l’hémolymphe non infectée a atteint 1520 µg/ml, alors que nous notons que la concentration de protéines dans l’hémolymphe infectée a atteint 1536µg/ml. En ce qui concerne les fonctions peptidiques, la concentration de protéines dans les fonctions peptidiques non infectées a été estimée à 3561µg/ml, tandis que nous notons la forte concentration de protéines dans les fonctions peptidiques infectées, où elle a été estimée à 6904 µg/ml.

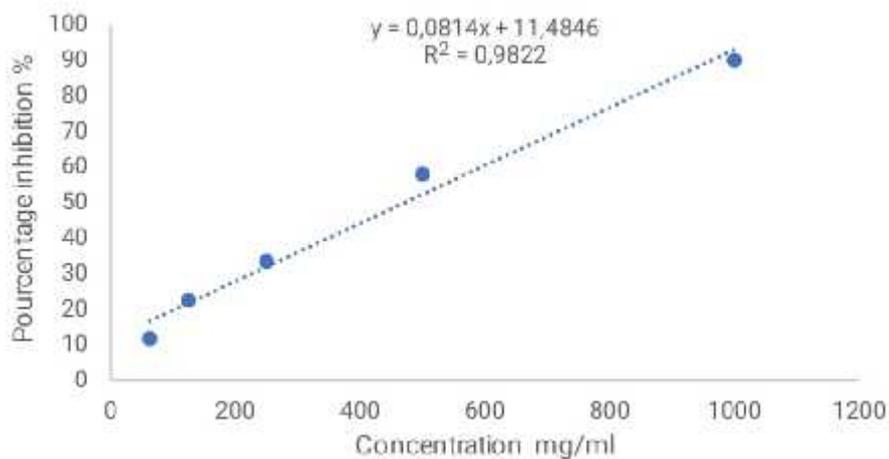


Figure 14: courbe d’étalonnage de l’albumine d’œuf

Chez les invertébrés, le système immunitaire inné protège contre un large éventail de infections microbiologiques (Al-Khalaïfa, 2022).

les cellules phagocytaires spécifiques des gastéropodes, les hémocytes, sont considérées comme le principal effecteur du système immunitaire inné, les hémocytes jouent un rôle crucial dans la reconnaissance, la liaison et l'inactivation des parasites, en effet, chez cette espèce de mollusque, les hémocytes sont les principaux efforts de défense immunitaire, car l'immunité humorale, caractérisée par les opsonines, a le seul rôle d'améliorer l'interaction des hémocytes parasitaires (Napoli et al., 2023).

Les mollusques n'ont pas d'immunité adaptative et dépendent d'une immunité innée ou non spécifique pour la défense de l'hôte. Ils possèdent un large éventail de récepteurs immunitaires innés de haute spécificité lors de la reconnaissance immunitaire sans le coût auto-immun en l'absence d'immunité adaptative (Al-Khalaïfa, 2022).

Le système immunitaire des invertébrés n'implique pas d'anticorps. Leur ligne de défense consiste principalement en une défense cellulaire; cependant, les facteurs humoraux sont essentiels pour se débarrasser des particules infectieuses. Les facteurs cellulaires comprennent des cellules phagocytaires capables de reconnaître le matériau du soi à partir du matériau du non-soi.

La phagocytose et l'encapsulation sont les principaux mécanismes par lesquels les particules étrangères sont éliminées chez les mollusques. Ces mécanismes impliquent le rôle des agglutinines, des opsonines et des lysozymes (Al-Khalaïfa, 2022).

III.3 Activité antibactérienne de lhémolymphe et la fraction peptidique de *Helix aspersa*

III.3.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination des paramètres antimicrobiens (CMI) Concentration Minimale Inhibitrice, d'hémolymphe et des Peptides d'escargot *Helix aspersa*, par la méthode de microdilution.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration en hemolymphe ou peptides qui inhibe toute croissance bactérienne. Elle a été déterminée grâce à l'utilisation des microplaques à 96 puits (chraïbi et al., 2018).

Les résultats relatifs à la microdilution sont illustrés dans le tableau 04 et la Figure15.

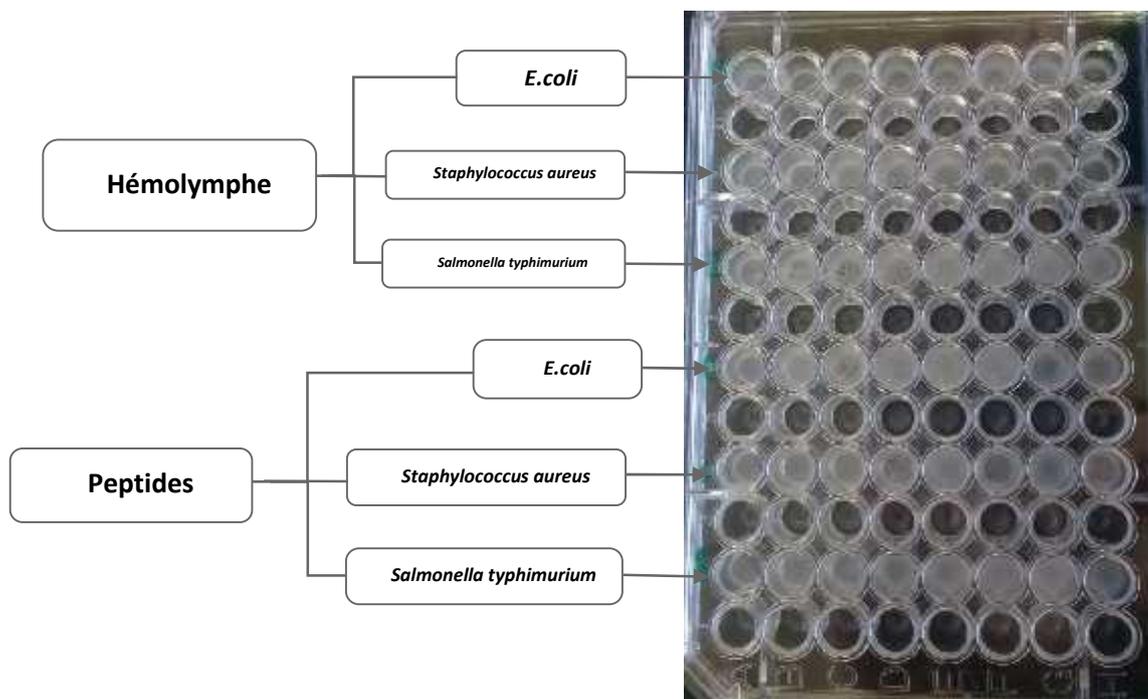


Figure 15: résultat de la méthode de microdilution de l'hémolymphe et les peptides de l'escargot *Helix aspersa*

Tableau 04: Valeurs de CMI d'activité anti-bactérien de l'hémolymphe et des Peptides

Lessouches	Hémolymphe	Peptides
<i>Escherichia coli</i>	100µL/mL	50µL/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	100µL/mL	50µL/mL
<i>Salmonella typhimurium</i>	100µL/mL	50µL/mL

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de zone d'inhibition dans les puits contenant de l'hémolymphe, donc l'hémolymphe n'a aucune activité contre les souches bactériennes utilisées.

Les peptides ont montré une activité minimale contre les souches bactériennes (*E.coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*) à une concentration de 50µL/mL, selon le résultat, les peptides bioactifs ont une activité antibactérienne contre les souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif.

Selon les résultats les Peptides possède un pouvoir antimicrobien plus important par rapport à l'hémolymphe, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) 50µL/mL.

Nos résultats sont en accord avec les travaux d'**Aleksova et al.(2021)**.

Les peptides antimicrobiens sont les peptides qui agissent directement pour protéger les animaux contre un large éventail de bactéries, champignons, virus et protozoaires, c'est-à-dire qui ont une activité antimicrobienne. Les peptides antimicrobiens ont une toxicité sélective envers les agents pathogènes bactériens sans altérer le tissu hôte. La paroi cellulaire microbienne est constituée de lipoprotéines qui servent de cible principale de désintégration pour prendre en compte l'activité antimicrobienne des peptides. Les peptides antimicrobiens contiennent principalement une structure - hélicoïdale de nature cationique et amphipathique, tandis que moins nombreux sont les peptides - hélicoïdaux hydrophobes (**Bhandar et al., 2019**).

Cette partie cationique des peptides est responsable sur l'interaction électrostatique avec les phospholipides anioniques conduisant à la formation des pores dans la membrane cytoplasmique. En raison de la formation de pores, il se produit un déséquilibre ionique à travers la membrane et, par conséquent, la lyse cellulaire. Également, ces AMP s'assemblent à la surface de la membrane cellulaire et s'y incorporent (**Bhandar et al., 2019**).

Selon **Ilieva et al. (2019)**, Il a été constaté que la fraction contenant des peptides de masses inférieures à 10 kDa démontrait une forte activité antibactérienne contre une souche bactérienne pathogène à Gram négatif *Escherichia coli*.

l'effet d'inhibition des fractions séparées d'*Helix aspersa* sur la croissance des bactéries n'était pas causé par les bactériophages; les expériences ont indiqué que la substance ayant une Mw comprise entre 30 et 100 kDa chez *H. aspersa* a une activité antimicrobienne (**Dolashki et al., 2018**)

III.4 Activité anti-oxydante

III.4.1 Test de DPPH

L'évaluation de la capacité d'hémolymphe et des peptides de l'escargot *Helix aspersa* à piéger le radical libre DPPH, les résultats relatifs à l'activité antioxydante sont illustrés dans la Figure 16

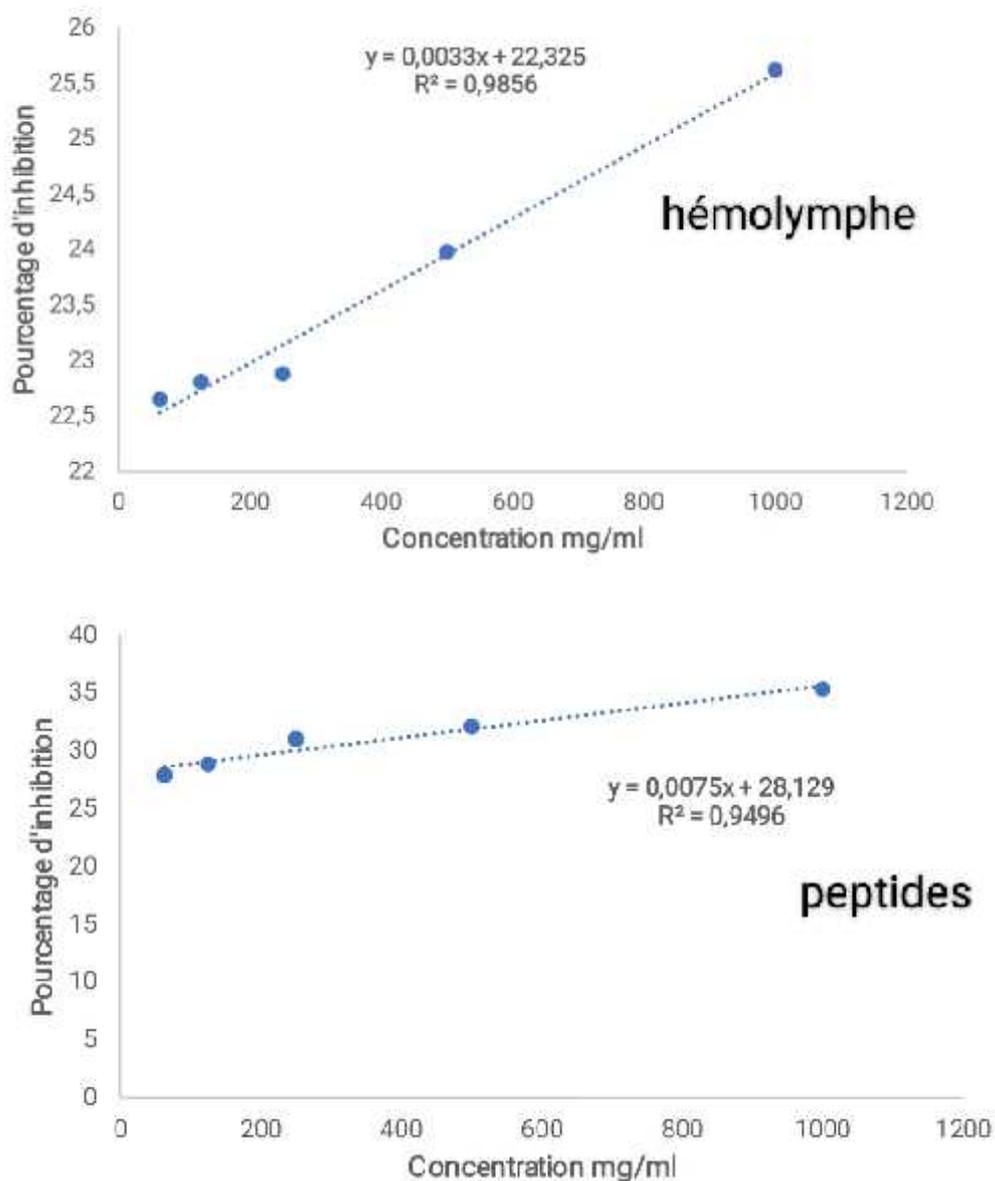


Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'hémolymphes et les Peptides d'escargot *Helix aspersa*.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition de radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration d'hémolymphes et des peptides. À la concentration la plus faible 62,5 μ L, le pourcentage d'inhibition pour l'hémolymphes est de 22,65% et de 27,89% pour les peptides. À la concentration la plus élevée de 1000 μ L, le pourcentage d'inhibition est de 25,62 % pour l'hémolymphes, et pour les peptides, il a été estimé à 35,31%.

Le pouvoir antiradicalaire de l'acide ascorbique (antioxydant standard) a été également évalué afin de le comparer à celui de l'hémolymphes et des peptides

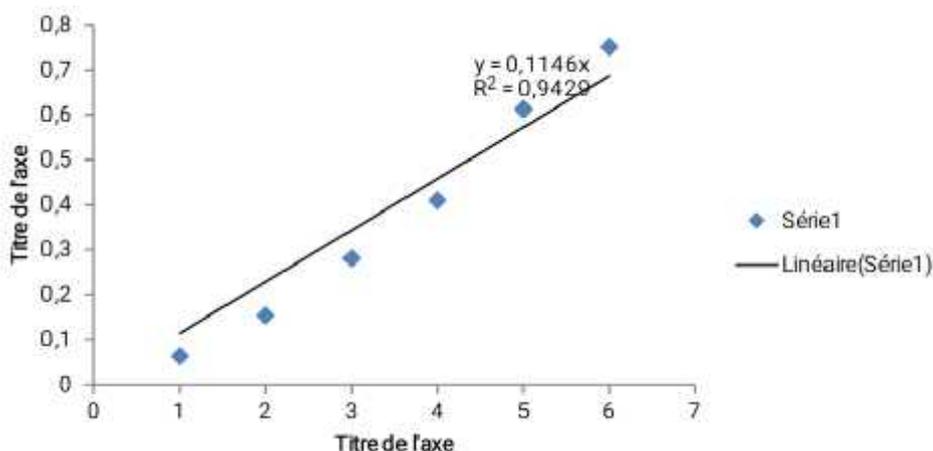


Figure 17: Courbe étalonnage de l'acide ascorbique

III.4.2 Evaluation de IC50

L' IC50 (Concentration d'inhibition) est la concentration de produit nécessaire pour réduire de moitié l'absorbance du radical DPPH (Coulombier, 2020). L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Ismaili et al., 2017).

À partir de l'équation linéaire des deux courbes des variations de la concentration de l'hémolymphe et des peptides en mg / ml en termes de pourcentage d'inhibition des radicaux libres, $Y=0,0033x+22,325$ et $0,0075x+28,129$ respectivement, nous calculons la valeur de la IC50. Et aussi IC50 est calculé pour l'acide ascorbique.

Tableau 05 : Les valeurs des IC50 des échantillons testés

L'échantillons	IC50
Hémolymphe	8386,36µg/ml
Peptides	2916,13µg/ml
Acides ascorbique	436,30µg/ml

Les résultats sont représentés dans le tableau 05 pour la valeur IC50 pour l'hémolymphe et peptides d'escargot *Helix aspersa*, ainsi que l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus montrent que l'IC50 de l'hémolymphe et des Peptides 8386,36 µg/ml et 2916,13µ/ml, respectivement, est plus élevée que la valeur d'IC50 d'acide ascorbique qui est 436,30µ/ml, cela signifie que l'activité antioxydante de l'hémolymphe et des peptides d'escargot *Helix aspersa* est extrêmement faible.

Selon **Lawal et al. (2015)**, qui a appliqué la méthode DPPH à l'hémolymphe de l'escargot *Achachatina maginata*, où il a trouvé, les radicaux DPPH ont été largement utilisés pour enquêter sur l'activité de balayage de certains composés naturels. Dans le test de piégeage de la DPPH, la valeur de la CI50 de l'hémolymphe (579,66±2,69 µg/mL) était supérieure à la valeur de la CI50 rapportée pour certaines plantes médicinales, par exemple 55,62 µg/mL.

La diminution de l'absorbance de la DPPH causée par l'hémolymphe est due à la réaction entre les molécules antioxydantes et le radical, ce qui entraîne le piégeage du radical par don d'hydrogène.

Le pouvoir réducteur d'un composé naturel peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Cependant, dans cette étude, l'hémolymphe d'*A. maginata* s'est avérée posséder une propriété réductrice très faible par rapport à l'acide ascorbique.

Des études sur les relations entre la structure et l'activité antioxydante ont été trouvées dans la littérature, et les résultats ont montré que la capacité antioxydante des peptides purifiés à partir de protéines est étroitement liée à certaines caractéristiques structurelles des peptides, telles que leur masse moléculaire, leurs compositions en acides aminés, leurs séquences et leur hydrophobicité (**Zou et al., 2016**).

III.5 Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée selon deux tests :

a) **Stabilisation des membranes des globules rouges humains HRBC** L'activité anti-inflammatoire d'hémolymphe et des peptides de l'escargot *Helix aspersa* a été évaluée par la méthode d'HRBC (membranes des globules rouges humains), et la gamme étalonnage de déclofinac, et les résultats relatifs à l'activité anti-inflammatoire par la méthode d'HRBC sont illustrés dans les figures 18.

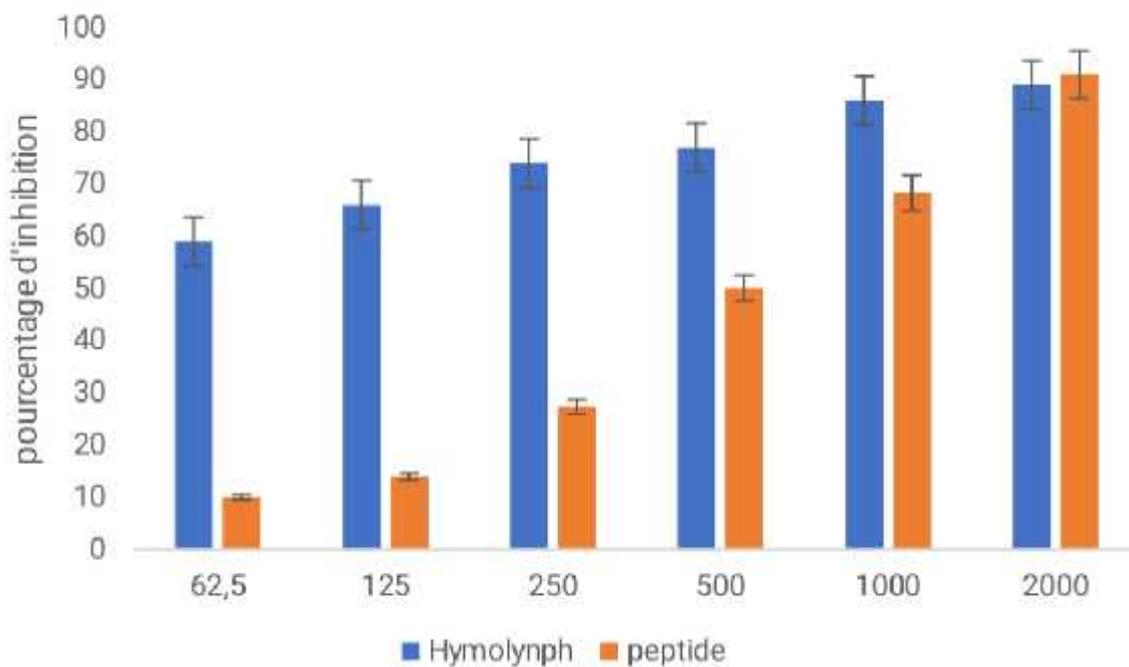


Figure 18: Activité anti-inflammatoire de lhémolymph et des peptides de l'escargot *Helix aspersa* par hémolyse.

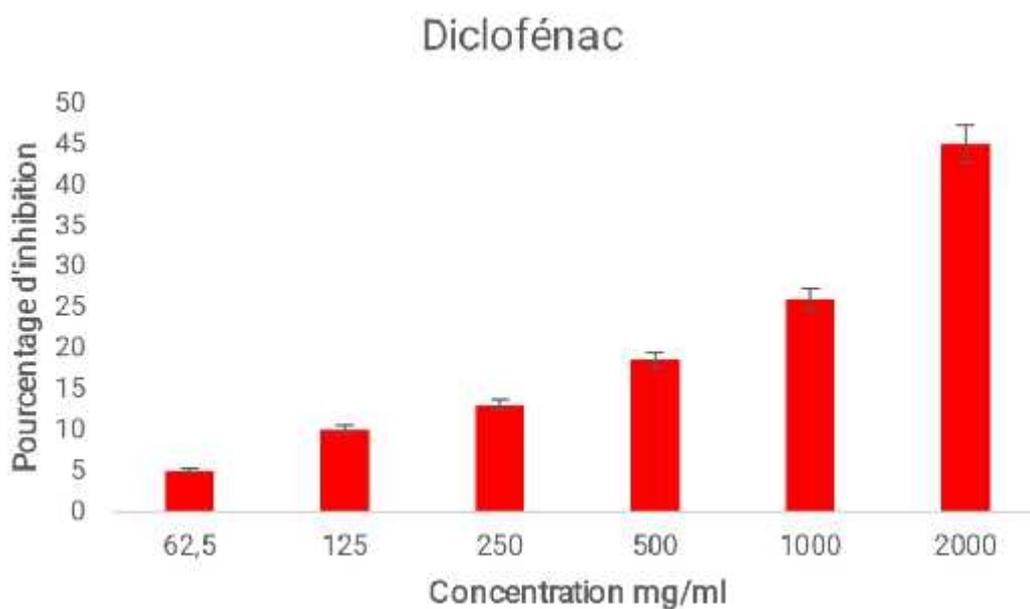


Figure 19: Activité antiinflammatoire du diclofénac

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro de l'hémolymphe et des fractions peptidique de l'escargot *Helix aspersa* Müller, qui repose sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges humains, par rapport à la solution standard Diclofénac de sodium, montrent que, plus la concentration de l'hémolymphe et de peptide est élevée, plus le pourcentage d'effet hémolytique est élevé. Comparés au pourcentage de diclofénac, les pourcentages de l'hémolymphe et des peptides sont supérieurs au pourcentage de solution du diclofénac.

L'effet protecteur de l'hémolymphe et des peptides est significativement plus prononcé comparativement à celui du diclofénac. où ils donnent un effet inhibiteur plus efficace que celui du diclofénac avec (50, 66, 74, 77, 86, 89%) de l'hémolymphe respectivement, et (10, 14, 27.36, 50.12, 68.28, 91) des peptides respectivement.

Selon **Shashanth et al. (2019)**, où la méthode HRBC a été appliquée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire du crabe, Les résultats expérimentaux ont montré que pour le corps du crabe étaient les plus élevés d'environ $69,02 \pm 2,28\%$ et $49,94 \pm 1,5\%$ pour la patte de crabe, le diclofénac sodique a été utilisé comme médicament standard qui a montré une activité anti-inflammatoire jusqu'à 90,76 %. Ainsi, les résultats ont montré que les hydrolysats du Corps du Crabe et de la patte du crabe ont une activité anti-inflammatoire.

Ainsi, les résultats ont montré que l'hémolymphe et les peptides, ont une activité anti-inflammatoire.

b) Test de l'inhibition de l'albumine

L'activité anti-inflammatoire in vitro a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. Les résultats relatifs sont illustrés dans la figure 20

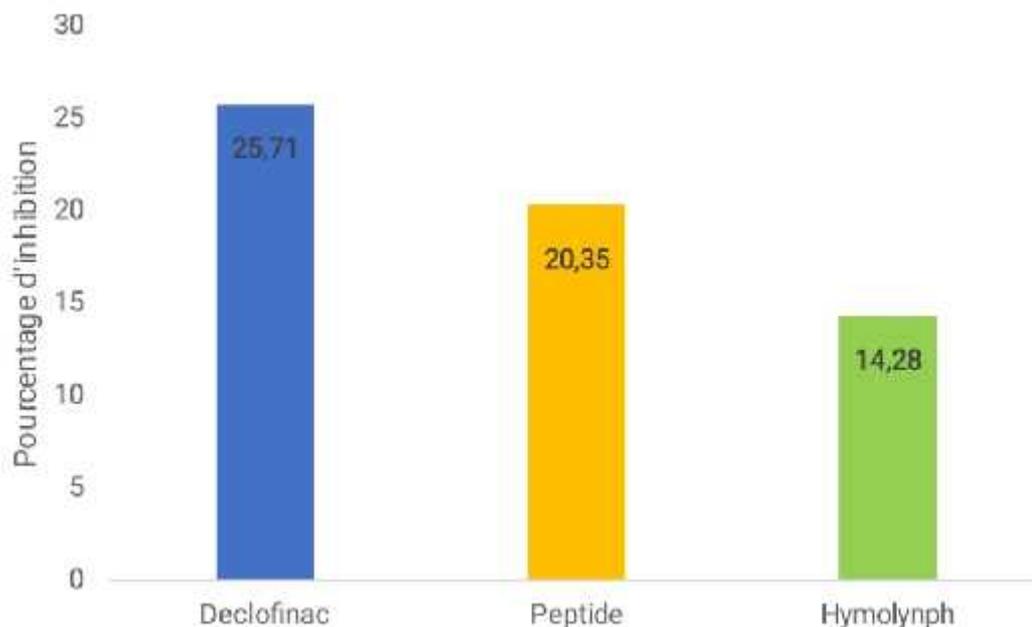


Figure 20: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'hémolymphe, des peptides et du Diclofenac.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine des peptides est plus élevé que le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'hémolymphe. Les deux échantillons étudiés ont un effet inhibiteur de la dénaturation d'albumine.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolymphe 14,28%. Ainsi, le pourcentage d'inhibition des peptides a été estimé à 20,35%, ce qui est une valeur très proche du pourcentage d'inhibition du diclofénac sodique, qui est de 25,71%, avec une différence de 5,36%.

Les résultats expérimentaux des peptides étaient similaires au pourcentage standard d'inhibition du diclofénac, car les peptides présentaient une activité anti-inflammatoire plus élevée que l'hémolymphe.

Selon **Shashanth et al. (2019)**, tous les peptides qui étaient hydrolysés avaient une propriété anti-inflammatoire, pour le corps du crabe avec $88,56 \pm 1,76\%$ et pour la patte de crabe avec $90,57 \pm 2,95\%$, le diclofénac sodique a été utilisé en standard et a montré une activité anti-inflammatoire de 95,97%. Les résultats expérimentaux étaient similaires au pourcentage standard d'inhibition qui prouvait que les hydrolysats présentaient des propriétés anti-inflammatoires

De plus, le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine pour l'escargot *Eremina desertorum* à une concentration de 2000 $\mu\text{g/ml}$ était supérieur à celui de l'aspirine à la

même concentration, avec taux d'inhibition de 92,8% et 85,3%, respectivement. Une augmentation significative de l'inhibition de l'activité protéinase était très similaire à celle de l'aspirine avec une inhibition de 89,9% et 89,2%, respectivement à une concentration de 2000 µg/ml (El-Zawawy et Mona, 2021).

Conclusion

Ce présent travail contribue à la caractérisation des activités anti-bactérienne, antioxydante et anti-inflammatoire de l'hémolymphe et les Peptides d'escargot *Helix aspersa* Müller.

L'activité anti-bactérienne a été évaluée par la méthode de microdilution, et la valeur CMI trouvée est égale à 50ul dans le peptide.

L'activité antioxydante a été explorée par la méthode de réduction du radical libre 1,1 diphenyl- 2-picryl-hydrazyl (DPPH), avec un IC50 8386,36µg/ml et 2916,13µg/ml de l'hémolymphe et biopeptides respectivement.

L'activité anti-inflammatoire a été effectuée sur les érythrocytes isolées à partir du sang humain, les résultats montre que l'hémolymphe et les biopeptides a un effet de la stabilité des membranes des globules rouges.

Les pourcentages dinhibition de la dénaturation des protéines sont de 14,28% pour l'hémolymphe et 20,35% pour les peptides, par rapport la diclofénac, ce qui représente un bon résultat. L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances biologiquement actives, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités anti-bactérienne, antioxydante et anti-inflammatoires de l'hémolymphe des escargots.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Abrashev R, Krumova E, Dolashki A, Kostadinova N, Miteva-Staleva J, Velkova L, Spasova B, Angelova M, Dolashka P, 2018. *Cornu aspersum*-derived peptides with biological activity. *Journal of Glycobiol* 7, 108.

Adeyeye SAO, Bolaji OT, Abegunde TA, Adesina TO, 2020. Processing and utilization of snail meat in alleviating protein malnutrition in Africa: a review. *Nutrition & food science*. 50 (6), 1085-1097. **Aleksova M, Velkova LP, Dolashka P, Radeva G, 2021.** Antibacterial activity of bioactive fractions from mucus and hemolymph of different snails species and crab. *Bulg. Chem. Commun* 53, 22-26.

AMEUR N, 2021. Caractérisation et évaluation des poussières et de leurs impacts sur la bio-écologie des Gastéropodes, dans la réGion dain toUta (Batna, ALGERIE). Thèse de doctorat: science biologique. Université Mustapha Ben Boulaid-Batna 2.pp 157 **Azeem HHAE, Osman GY, El-Seedi HR, Fallatah AM, Khalifa SAM, Gharib MM, 2022.** Antifungal Activity of Soft Tissue Extract from the Garden Snail *Helix aspersa* (Gastropoda, Mollusca). *Molecules* 27 (10), 3170

B

Bammou M, Bouhlali EDT, Sellam K, El-Rhaffari L, Ibijbijen J, Nassiri L, 2022. Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton. *Phytothérapie* 20 (1), 2-9.

Bhandari D, Rafiq S, Gat Y, Gat P, Waghmare R, Kumar V, 2020. A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26, 139-150.

C

Ça ıltay F, Erkan N, Tosun D, Selçuk A, 2011. AMI NO ACI D, FATTY ACI D, VI TAMI N AND MI NERAL CONTENTS OF THE EDI BLE GARDEN SNAI L (*Helix aspersa*). *J. FisheriesSciences. com* 5 (4), 354-363

Çelik MY, Dernekba i S, Sariipek M, Karayücel S, 2022. The reproductive response of *Cornu aspersum* to different hibernation conditions. *Molluscan Research* 42 (3), 253-259.

Chen W, Ding H, Feng P, Lin H, Chou KC, 2016. iACP: a sequence-based tool for identifying anticancer peptides. *Oncotarget* 7 (13), 16895.

Chraibi M, Fikri-Benbrahim K, Amrani M, Farah A, Bari A, Benziane Ouaritini Z, 2018. Etude ethnobotanique sur l'utilisation de *Mentha pulegium*, *Mentha piperita* et *Pelargonium graveolens* au nord du Maroc (Taounate) et évaluation de leur pouvoir antimicrobien. *European Scientific Journal* 14 (24), 113-133.

Coulombier NDB, 2020. ÉVALUATION DES MICROALGUES SÉLECTIONNÉES EN NOUVELLE-CALÉDONIE COMME SOURCE POTENTIELLE D'ANTI-OXYDANTS NATURELS: Identification des molécules anti-radicalaires et stimulation de leur biosynthèse par orientation métabolique. Thèse de doctorat. Biologie des organismes. *UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE*. p208.

D

Debalke D, Birhan M, Kinubeh A, Yayeh M, 2018. Assessments of Antibacterial Effects of Aqueous-Ethanollic *Extracts of Sida rhombifolias Aerial Part*. 8.

Dolashka P, Dolashki A, Velkova L, Stevanovic S, Molin L, Traldi P, Velikova R, Voelter W, 2015. Bioactive compounds isolated from garden snails. *Journal of BioScience & Biotechnology*. 147-155.

Dolashki A, Nissimova A, Daskalova E, Velkova L, Topalova Y, Hristova P, Traldi P, Voelter W, Dolashka P, 2018. Structure and antibacterial activity of isolated peptides from the mucus of garden snail *Cornu aspersum*, *Bulgarian Chemical Communications C*, 50, 195-200.

Dolashki A, Velkova L, Daskalova E, Zheleva N, Topalova Y, Atanasov V, Voelter W, Dolashka P, 2020. Antimicrobial Activities of Different Fractions from Mucus of the Garden Snail *Cornu aspersum*. *Biomedicines* 8 (9), 315.

Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C, 2008, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3632-3639p.

E

El-Zawawy NA, Mona MM, 2021. Antimicrobial efficacy of Egyptian *Eremina desertorum* and *Helix aspersa* snail mucus with a novel approach to their anti-inflammatory and wound healing potencies. *Scientific Reports* 11 (1), 2431.

F

Fumex M, 2019. Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine pharmaceutique: description, comparaison et nouvelles perspectives. Thèse de doctorat. Faculté de pharmacie, universitaire de Lorraine. pp 112.

G

Georgieva A, Todorova K, Iliev I, Dilcheva V, Vladov I, Petkova S, Dolashki A, Lyudmila Velkova, Pavlina Dolashka, Reneta Toshkova, 2023. Assessment of the In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Hemocyanins from *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, and *Rapana venosa* in a Graffi Myeloid Tumor Model. *Biomedicines* 11 (6), 1545.

Georgieva A, Todorova K, Iliev I, Dilcheva V, Vladov I, Petkova S, Toshkova R, Velkova L, Dolashki A, Dolashka P. 2020. Hemocyanins from *Helix* and *Rapana* snails exhibit in vitro antitumor effects in human colorectal adenocarcinoma. *Biomedicines* 8(7):194.

H

Hayes M, Mora L, 2021. Alternative Proteins as a Source of Bioactive Peptides: The Edible Snail and Generation of Hydrolysates Containing Peptides with Bioactive Potential for Use as Functional Foods. *Foods* 10 (2), 276.

I

Ismaili R, Houbairi S, Sanâa L, Khadija M, Abdeslam L, 2017. Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales marocaines. *European Scientific Journal* 13 (12), 323

K

Kostadinova N, Voynikov Y, Dolashki A, Krumova E, Abrashev R, Kowalewski D, Stevanovic S, Velkova L, Velikova R, Dolashka P, 2018. Antioxidative screening of fractions from the mucus of garden snail *Cornu aspersum*. *Bulg. Chem. Commun* 50, 176-183.

L

Lawal B, Shittu OK, Ossai PO, Abubakar AN, Ibrahim AM, 2015. Evaluation of antioxidant activity of giant African snail (*Achachatina maginata*) haemolymph in CCl₄-induced hepatotoxicity in albino rats. *Br J Pharm Res* 6 (3), 141-54

Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, Mackey V, Coy DH, He Q, 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Revue américaine de recherche translationnelle* 11 (7), 3919.

Louzon M, 2020. Développement d'indicateurs chimiques et biologiques pour l'évaluation des risques environnementaux des sites et sols contaminés. Thèse de doctorat Biologie des organismes, UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE. pp 355.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent., *Journal of Biological Chemistry* 193(1) : 267-275.

M

Machałowski T, Jesionowski T, 2021. Hemolymph of molluscan origin: From biochemistry to modern biomaterials science. *Applied Physics A* 127, 1-22.

Matusiewicz M, Kosieradzka I, Niemiec T, Grodzik M, Antushevich H, Strojny B, Gołbiewska M. 2018. In vitro influence of extracts from snail *Helix aspersa* müller on the colon cancer cell line Caco-2. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4):1064.

Matusiewicz M, Marczak K, Kwiecińska B, Kupis J, Zglińska K, Niemiec T, Kosieradzka I, 2022. Effect of extracts from eggs of *Helix aspersa maxima* and *Helix aspersa aspersa* snails on Caco-2 colon cancer cells. *PeerJ* 10, e13217.

Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. & Roch, P. (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*., *Eur. J. Biochem* (265) : 7178.

Mlle BAIRI Y, 2020. Biosurveillance de la qualité des sols par utilisation d'une espèce bioindicatrice de la pollution *Helix aspersa* (mollusque, gasteropode): impact de l'oberon. Thèse de doctorat: science biologique. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA. pp 341.

Murgia G, Loi F, Cappai S, Cogoni MP, 2022. Entomological Investigation of the Main Entomological Adversities for Terrestrial Gastropods *Helix aspersa* Müller (Mollusca Gastropoda Pulmonata): A Preliminary Study in Sardinian Heliciculture Farms. *Insects* 13 (7), 660.

Napoli E, Sfacteria A, Rifici C, Mazzullo G, Gaglio G, Brianti E, 2023. Reaction of *Cornu aspersum* Immune System against Different *Aelurostrongylus abstrusus* Developmental Stages. *Pathogens* 12 (4), 542

P

Pissia MA, Matsakidou A, Kiosseoglou V, 2021. Raw materials from snails for food preparation. *Future Foods* 3, 100034.

S

Salmi A, 2018. Études de la toxicité d'une pollution mixte de sélénium de Cadmium et de Novaluron sur *Helix aspersa*. Thèse de doctorat: science biologique. Université Laarbi Tebessi Tebessa. pp 140.

Shashanth D, Prasanna Raghavender S, JOSHUA ABRAHAM M, 2019. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-INFLAMMATORY PEPTIDES FROM MARINE CRAB AND THEIR EFFECTS. *SRM Institute of Science and Technology*.

Skandamis P.N., Nychas G.J.E, 2001, Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022p

T

Tasiemski, A., Schikorski, D., Le Marrec-Croq, F., Pontoire-Van Camp, C., Boidin-Wichlacz, C. & Sautière P. E. (2007). Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*., *Dev. & Comp. Immunol* (31): 749762.

Tancheva L, Lazarova M, Velkova L, Dolashki A, Uzunova D, Minchev B, Petkova-Kirova P, Hassanova Y, Gavrilova P, Tasheva K, Taseva T, Hodzhev Y, Atanasov AG, Stefanova M, Alexandrova A, Tzvetanova E, Atanasov V, Kalfin R, Dolashka P, 2022. Beneficial Effects of Snail *Helix aspersa* Extract in an Experimental Model of Alzheimers Type Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1-21.

Toader-Williams A, Golubkina N, 2009. Investigation upon the edible snails potential as source of selenium for human health and nutrition observing its food chemical contaminant risk factor with heavy metals. *Bulletin UASVM Agriculture* 66 (2), 495-499.

V

Vassilev NG, Simova SD, Dangalov M, Velkova L, Atanasov V, Daloshki A, Daloshka P, 2020. An 1H NMR- and MS-Based Study of Metabolites Profiling of Garden Snail *Helix aspersa* Mucus. *Metabolites* 10 (9), 360.

Z

Zaafour M, Meddour A, Boulakoud MS, 2014. Biométrie et dosage du glutathion chez *Helix aspersa* Müller (Gastropoda; Helicidae) en zones agricole et urbaine polluée dans la région d'El-Hadjar (Annaba, Algérie). *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie* 28, 96-105.

Zou TB, He TP, Li HB, Tang HW, Xia EQ, 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* 21 (1), 72.

Annexes

Annexes

- **Préparation de Mueller Hinton (g/l)**

Extrait de viande03g.

Tryptone 17.5g.

Amidon 1.5g.

Agar.....8g pour MH semi-solide et 16 g pour MH gélosé.

PH 7.3 ± 0.2 . La composition de milieu de culture, est calculée pour un litre de milieu de culture.

- **Préparation de PBS :**

-Préparez 800 mL d'eau distillée dans un récipient approprié.

-Ajoutez 8 g de Chlorure de sodium à la solution.

-Ajoutez 0,2 g de chlorure de potassium à la solution.

-Ajoutez 1,44 g de phosphate de sodium dibasique à la solution.

-Ajoutez 0,245 g de Potassium Phosphate Monobasique à la solution.

-Ajuster la solution au pH souhaité (généralement pH $\approx 7,4$).

-Ajoutez de l'eau distillée jusqu'à ce que le volume soit 1 L.

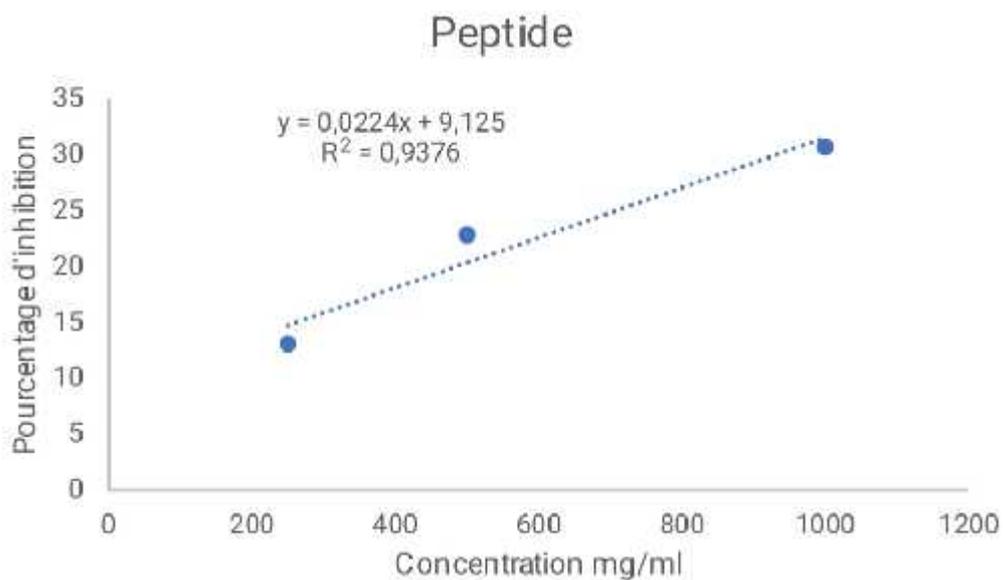
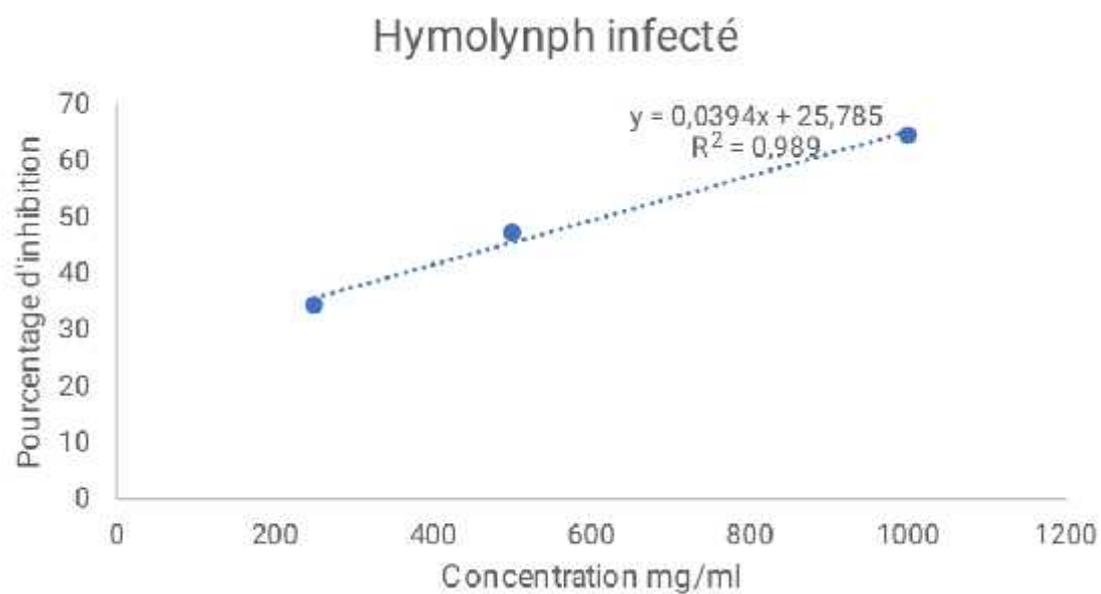


Figure 01: Courbes de pourcentage d'inhibition de l'hémolymph et les peptides d'escargot *Helix aspersa*

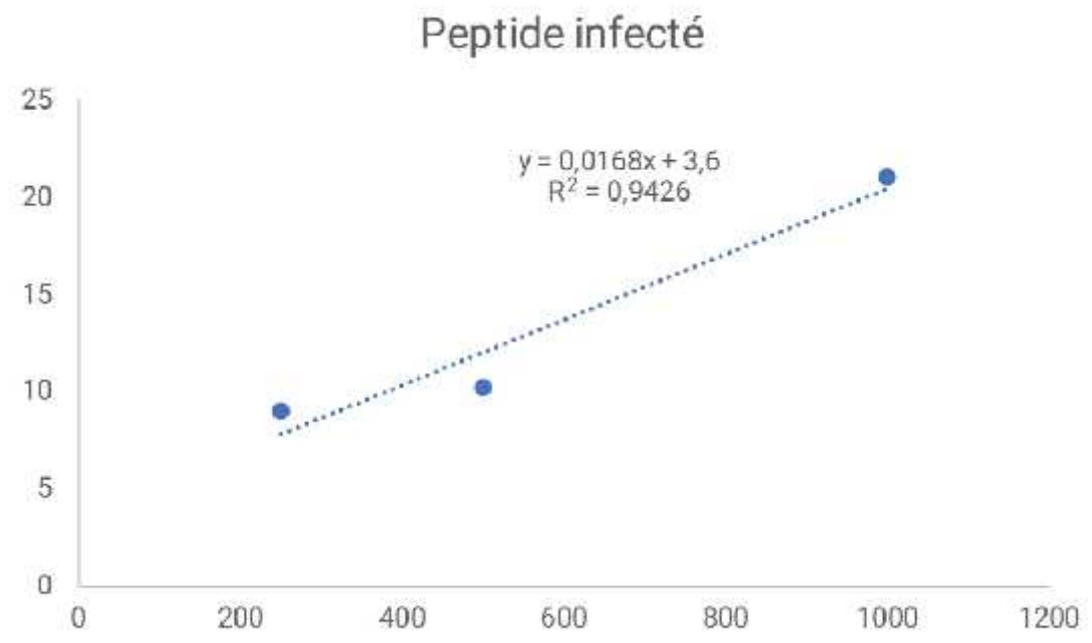
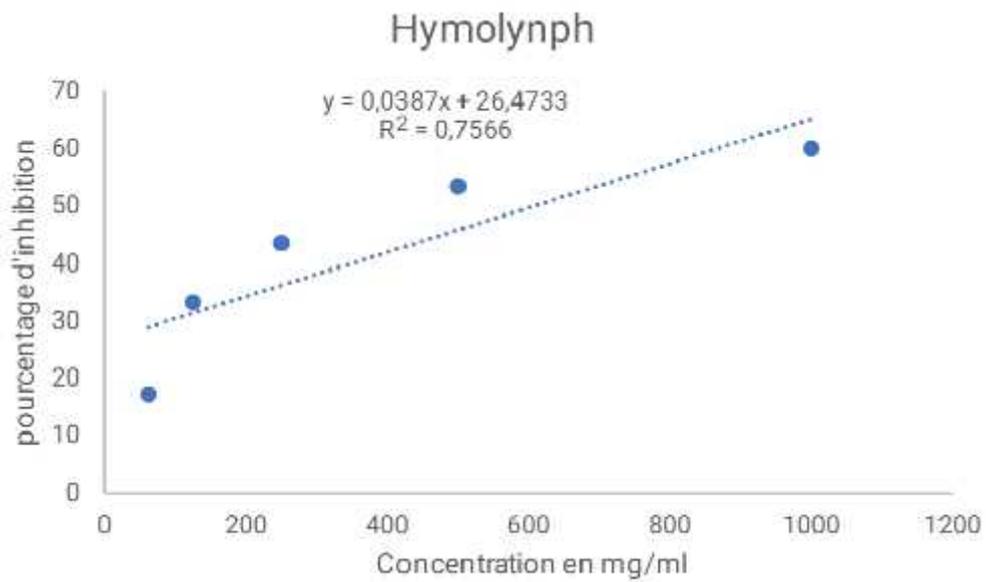


Figure 02: Courbes de pourcentage d'inhibition de l'hémolymph infecté et les peptides infecté d'escargot *Helix aspersa*

