



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohammed El Bachir El Ibrahim B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

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

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



# Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques.

Spécialité : Biochimie.

## Intitulé :

**Evaluation de l'activité antioxydante de la bave *d'Helix*  
*aspersa*.**

### Présenté par:

Abdessettar Imène & Ben abd Allah Rania Afaf & Derradj Sérine.

Soutenu le 24 / 06/ 2023, Devant le Jury :

<b>Président :</b>	Mme. FATMI Widad	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
<b>Encadrant :</b>	Mme MEZITI Asma	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj
<b>Examineur :</b>	M.BELLIK Yuva	Pr	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2022/2023

# **REMERCIEMENTS**

*Avant tout nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la patience, la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre encadreur Mme **MEZITI Asma**, de nous avoir proposé ce sujet. D'avoir accepté de nous encadrer, soutenir et encourager, pour sa gentillesse, pour ces précieux conseils au bon déroulement de ce travail.*

*Nous exprimons nos remerciements aux membres de jury, d'avoir accepté d'examiner ce travail, et tout particulièrement la présidente Mme **FATMI Widad** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire, qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect. Monsieur **BELLIK Yuva** qui a accepté de juger ce travail.*

*Un grand merci pour Monsieur **Merzouki Youcef** pour nous avoir acheté l'espèce d'escargot des stations d'étude.*

*Nous remercions aussi tous les ingénieurs de laboratoire de la biochimie et zoologie pour leur aide durant la période de la pratique.*

*Nos remerciements vont également à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation pendant cinq ans.*

*Enfin nous remercions toutes les personnes qui ont aidés de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire*

*A mes chers parents ma mère et mon père, merci de m'épauler pour que je puisse  
atteindre mes objectifs*

*A mon cher frère pour son soutien moral et ses conseils précieux*

*A toutes ma famille, mes amies*

*A mon binôme sérine & Rania*

*Imène*

# *Dédicace*

*Je remercie Dieu, qui nous a donnés la force et la patience de compléter cet humble mémoire.*

*Avec mes sincères remerciements, je dédie ce modeste travail*

*À ma famille pour les encouragements et l'amour que j'ai reçus toute ma vie.*

*À mon grand-père, paix a son âme. Qui m'a accablé de sa tendresse et de sa prière qui m'accompagne encore, votre mémoire ne m'a pas quitté et ne me quittera pas pour toujours.*

*À mon grand-père, paix a son âme. Qui m'a chargé de sa tendresse et de sa prière, qui m'accompagne toujours, ton souvenir ne m'a pas quitté et ne me laissera pas pour toujours.*

*.À mon idole de toujours, symbole du sacrifice et de la tendresse, mon très cher père M. Hocine. Aucun mot ne peut exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous*

*Aux merveilleuses femmes qui sont plus que de simples mères, qui m'ont élevée avec leur amour et leurs attention illimités, m'ont soutenue tout au long de ma vie sans elles je ne deviendrais pas ce que je suis. À mes adorables SADIA et HAFSA ; mots ne peuvent décrire ni mon amour sans limites ni ma gratitude envers vous. Je suis tellement reconnaissante de vous avoir dans ma vie.*

*Que Dieu vous protège et vous accorde-le bonheur, la santé et la longue vie*

*À mes adorables sœurs SANA et SOUHILA qui ont été là pour moi et m'ont encouragée toute ma vie et m'ont soutenue avec leur amour, leurs conseils et leur aide. J'apprécie tout ça.*

*À mon charmant petit frère DJELLAL qui me fait toujours sourire avec son enfance et sa spontanéité qu'ALLAH le protège de tout mal.*

*À mon chère Sérine. Imene.*

*À tous les collègues de ma promotion.*

*Rania Afaf.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail:*

*A mon cher père que Dieu l'accueille en son vaste paradis*

*Grand plaisir à ma Méré pour son sacrifice, et m'avoir encouragé à étudier, d'avoir été à mes côtés dans les circonstances et les moments les plus difficiles, et d'être à la fois la mère et le père a nous*

*A ma belle, ma chère sœur, pour son conseil, son soutien et son amour*

*A mes frères, mes bras qui m'ont enseigné beaucoup de choses*

*À mes binômes et toute sa famille.*

*Sérine*

# *Sommaire*

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

<b>Introduction .....</b>	<b>01</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>05</b>
<b>1. Matériel.....</b>	<b>06</b>
<b>1.1.Matériel animal.....</b>	<b>06</b>
<b>1.1.1. Morphologie d'<i>Helix aspersa</i> .....</b>	<b>07</b>
<b>1.1.2. Entretien des escargots .....</b>	<b>08</b>
<b>1.2.Matériel de laboratoire.....</b>	<b>08</b>
<b>1.2.1. Produits chimiques.....</b>	<b>08</b>
<b>1.2.2. Appareillage .....</b>	<b>09</b>
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>09</b>
<b>2.1.Extraction de la bave.....</b>	<b>09</b>
<b>3. Etude de l'activité antioxydante .....</b>	<b>09</b>
<b>3.1.Piégeage du radicale DPPH.....</b>	<b>09</b>
<b>3.2.Test de blanchissement du <math>\beta</math>-carotène.....</b>	<b>10</b>
<b>Résultat et discussion.....</b>	<b>12</b>
<b>1. Test de l'activité antioxydante.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.Piégeage du radicale DPPH.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.Test de blanchissement du <math>\beta</math>-carotène.....</b>	<b>16</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>19</b>
<b>Référence bibliographiques.....</b>	<b>21</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Quantité et densité de la bave de l'espèce <i>Helix aspersa</i> .....	13
---	----

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> <i>Helix aspersa</i> .....	6
<b>Figure 2:</b> Morphologie d' <i>Helix aspersa</i> .....	7
<b>Figure 3:</b> Coquille d' <i>Helix aspersa</i> .....	8
<b>Figure 4:</b> Escargots <i>Helix aspersa</i> .....	8
<b>Figure 5:</b> Réduction du radical DPPH .....	10
<b>Figure 6:</b> La bave d' <i>Helix aspersa</i> .....	13
<b>Figure 7:</b> Activité antiradicalaire de la bave d' <i>Helix aspersa</i> .....	15
<b>Figure 8:</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène à 490nm en absence et en présence de la bave d' <i>Helix aspersa</i> et du BHT.....	16
<b>Figure 9:</b> Pourcentage d'inhibition de blanchissement du $\beta$ -carotène de l'extrait de la bave d' <i>Helix aspersa</i> et du BHT. ....	16

## Liste des abréviations

<b>DPPH</b>	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
<b>BHT</b>	Butylhydroxytolène
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>OH·</b>	Radical hydroxyle
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>S. aureus</b>	Staphylococcus aureus
<b>S.epidermidis</b>	Staphylococcus epidermidis
<b>E. coli</b>	Escherichia coli

## الملخص

في السنوات الاخيرة، اصبح اكتشاف العوامل العلاجية الجديدة هدفا مثيرا لاهتمام الباحثين و دراسة المكونات النشطة بيولوجيا المختلفة لللافقاريات مهمة للغاية. من اجل هذا تم تميز مخاط الحلزون *Helix aspersa* الذي ينتمي الى عائلة Helicidae بسبب وظائفه المتعددة. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمخاط الحلزون *Helix aspersa*.

يكشف استخلاص اللعاب بتقنية الصدمة الحرارية ان المحصول يتناقص حيث تكون الكمية الناتجة عن عمليتي استخلاص 60 مل و 28 مل على التوالي. يظهر ثراء مخاط *Helix aspersa* بالبروتينات السكرية كثافة تبلغ حوالي 1,45 جم / مل . يؤكد التقييم الكمي لقوة الاصطياد للمستخلص فيما يتعلق DPPH ان المخاط له نشاط مضاد الاكسدة مع نسبة تثبيط تقارب 41,63% و مع ذلك يكشف اختبار التبييض بيتا كاروتين ان المستخلص له نشاط مثبط ضئيل للغاية يبلغ حوالي 6% .

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان الحلزون اللزج *Helix aspersa* له نشاط مضاد للأكسدة اعتمادا على تركيبته الكيميائية .

**الكلمات المفتاحية:** *Helix aspersa*، DPPH، المخاط، البيتا كاروتين، النشاط المضاد للأكسدة

## Résumé

Ces dernières années, la découverte de nouveaux agents thérapeutiques est devenue un but intéressant pour les chercheurs et l'étude de divers composants bioactifs des invertébrés est extrêmement pertinente. Pour cette question le mucus de l'escargot *Helix aspersa* qui appartient à la famille Helicidae a été signalé en raison de leurs multiples fonctions. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante de la bave d' *Helix aspersa*.

L'extraction de la bave par la technique du choc thermique révèle que le rendement diminue où les volumes récupérés de deux extractions sont respectivement 60ml et 28ml. La richesse de mucus *Helix aspersa* avec des glycoprotéines montre une densité d'environ 1,45 g/ml. L'évaluation quantitative du pouvoir piégeur de l'extrait vis-à-vis du DPPH confirme que la bave a une activité antioxydante avec un pourcentage d'inhibition d'environ 41,63%, cependant le test du blanchissement du  $\beta$ -carotène révèle que l'extrait a une activité inhibitrice très négligeable d'environ 6%.

Les résultats obtenus montrent que la bave d'escargot *Helix aspersa* possède une activité antioxydante dépend de sa composition chimique.

**Mots clé:** *Helix aspersa*, DPPH, bave,  $\beta$ -carotène, Activité antioxydante.

## **Abstract**

These last years, the discovery of new therapeutic agents has become an interesting goal for researchers and the study of various bioactive components of invertebrates is extremely relevant. For this question the mucus snail *Helix aspersa* which belongs to the Helicidae family was distinguished because their multiple functions. The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity of snail slime *Helix aspersa*.

The extraction of snail slime by the heat shock technique reveals that the yield decreases where the volumes recovered from two extractions are respectively 60ml and 28ml. The richness of *Helix aspersa* mucus with glycoproteins shows a density of about 1,45 g/ml. The quantitative evaluation of the scavenging power of extract with respect to DPPH confirms that the slime has antioxidant activity with an inhibition percentage of approximately 41,63%, however the  $\beta$ -carotene bleaching test reveals that the extract has a very negligible inhibitory activity of about 6%.

Results obtained show that the snail slime *Helix aspersa* has an antioxidant activity depending on its chemical composition.

**Key Word:** *Helix aspersa*, DPPH, mucus,  $\beta$ -carotene, antioxidant activity.

# *Introduction*

Les escargots terrestres constituent une petite partie du grand phylum animal que constituent les mollusques avec environ 80 000 espèces. Il est numériquement le second du règne animal après les arthropodes qui incluent les insectes, les arachnides et les crustacés. La taille et la morphologie des gastéropodes varient considérablement mais ils possèdent en commun quelques caractères qui permettent de les reconnaître aisément des autres invertébrés : pied constitué de muscles, manteau recouvrant les organes internes et une coquille recouvrant une partie du corps. Les escargots sont des mollusques gastéropodes terrestres, pulmonés, appartient à l'ordre des stylomatophora (**Bonnet et al., 1990**).

Les escargots comestibles occupent aussi une place importante dans la médecine populaire. La chair d'escargot qui est riche en protéines (12-16%) et en fer (45-50mg/kg) mais pauvre en lipides, elle contient par ailleurs presque tous les acides aminés indispensables au corps humain et fait partie des remèdes efficaces dans le traitement de l'anémie (**Cobbinah et al., 2008**).

*Helix aspersa* est un Gastéropode de la famille des Helicidae (**Bonnet et al., 1990**). C'est une espèce d'escargot comestible facile à récolter et très répandue sur la façade méditerranéenne algérienne surnommé le « Petit-gris ». Il vit principalement dans les jardins, les lieux cultivés, les friches, les haies.

En plus de son usage nutritionnelle, *Helix aspersa* est un excellent bioindicateur de pollution terrestre plus efficace que le Ver de terre *Lumbricus terrestris* (**Gomot-de Vaufléury et Pihan, 2000**). En raison de sa sédentarité sur les sols et de son régime herbivore il est aisément contaminé par les métaux lourds et divers polluants présents dans l'air, le sol et la flore, d'où l'intérêt de son utilisation comme organisme test en écotoxicologie (**Zafour, 2014**).

Ces escargots sécrètent des sécrétions visqueuse et translucide appelées bave ou mucus contenant de nombreux composants mucopolysaccharides et glycoprotéines (**Etim et al., 2016**). Permettent à la fois d'avancer plus facilement en glissant sur les obstacles et de se fixer même verticalement sur certaines parois (**Etim et al., 2016 ; Cilia et Fratini, 2018 ; McDermott et al., 2021**). Le mucus sert également à protéger l'animal contre la dessiccation et l'infection par des micro-organismes en raison de ses propriétés antimicrobiennes (**Nantararat et al., 2019**).

D'après la bibliographie, il existe très peu de connaissances sur les structures histologiques qui sécrètent le mucus chez *Helix aspersa* ou même chez d'autres espèces.

Selon Heusser et Dupuy (2011) le mucus est secrété par la glande pédieuse (une glande située au cœur de l'extrémité avant du pied) et les cellules épidermiques glandulaires du pied. L'escargot a d'autres glandes productrices de mucus : la glande salivaire et la glande de mucus. Il possède également des glandes situées sur le bord du manteau (couche interne de la coquille) permettent aussi de créer le voile muqueux pour l'hibernation appelé hibernaculum. Ces glandes permettent en priorité de protéger l'escargot de se déshydrater. Elles produisent un mucus riche en pigment, ce sont des cellules épidermiques sécrétant une matière colorant la coquille et qui produit une mousse jaunâtre lorsque les escargots paniquent (<https://manonmmaa.wixsite.com>).

La composition du mucus d'escargot varie selon l'espèce, le rôle, le degré d'adhésion, il contient 90% à environ 99,7% d'eau (**Denny, 1983**). Les autres ingrédients sont les enzymes glycoprotéiques et peptides antimicrobiens (**Waluga-Kozłowska et al., 2021**).

Le principal constituant responsable des propriétés du mucus sont les mucines sécrétées, une famille de protéines fortement glycosylées (**McDermott et al., 2021**) couplés à des thérapeutiques approuvées afin de potentialiser les capacités du médicament à guérir des maladies, telle que le diabète et le colite ulcéreuse (**Gugu et al., 2020**). Elle a montré un potentiel thérapeutique contre le mélanome, l'un des cancers de la peau dangereux (**Ellijimi et al., 2018**).

La protéine qui confère aux tissus une résistance mécanique en l'étirant et également indispensable à la cicatrisation de la coquille de l'escargot est le collagène. Le mucus contient élastine qui est une chaîne polypeptidique longue de 830 acides aminés, elle est constituée majoritairement de prolines et de glycines considéré comme un allié indispensable de la souplesse et de l'élasticité de la peau il gomme les rides, réduit les vergetures et atténue l'acné. Ainsi que les vitamines A, E, C qui ont un pouvoir protecteur, nourrissant, anti-inflammatoire et antioxydant pour les vitamines C et E et l'acide glycolique qui aide à détruire les bactéries et stimule la production de collagène (**Bonnemain, 2003**). Les glycoprotéines telles que achaine sont probablement les composants impliqués dans l'activité antimicrobienne du mucus d'escargot (**Cilia et Fratini, 2018**).

Les sécrétions de mucus ont un large éventail d'activités biologiques et pharmacologiques:

Le mucus de *Helix aspersa* a démontré une activité antimicrobienne contre plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Pitt *et al.*, 2015). Il présente un large spectre d'activités antimicrobiennes contre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Helicobacter pylori* et *Propionibacterium acnes* (Dolashka *et al.*, 2015). Ainsi il a été confirmé que la bave d'*Helix aspersa* améliorerait l'inflammation du côlon, car elle contenait des composants anti-inflammatoires et antioxydants (Hatuikulipi *et al.*, 2016).

Le mucus d'escargot est utilisé dans le secteur cosmétique soit directement, soit sous forme de crème commerciale avec des effets régénérants de la peau lutte contre l'acné, des plaies cicatrisantes (Greistorfer *et al.*, 2017). Le mucus intervient dans la protection et répartition de la peau et grâce à la présence de mucopolysaccharides, de l'acide glycolique et l'allantoïne (Trapella, 2018 ; Gentili *et al.*, 2020). Environ 80% de la peau est composée d'élastine et de collagène ces protéines sont naturellement présentes dans la bave d'escargot et déterminent les propriétés de souplesse et d'élasticité de la peau ([www.mlle-agathe.fr](http://www.mlle-agathe.fr)).

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les capacités cellulaires antioxydantes. Les radicaux libres ont longtemps été considérés comme des sous-produits toxiques impliqués dans de nombreuses pathologies (Migdal et Serres, 2011), ces radicaux peuvent être dérivés de l'oxygène comme l'anion radicalaire superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical libre hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ), le radicale alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) et le radicale peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ). Ainsi que des dérivés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) sont appelées espèces réactives oxygénés (ERO), ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives azotés (ERA)) (Kalam *et al.*, 2012). Un antioxydant est une molécule capable d'inhiber l'oxydation d'une autre molécule. Il brise la chaîne de réactions des radicaux libres en sacrifiant leurs propres électrons pour nourrir les radicaux libres sans devenir eux-mêmes des radicaux libres. Afin de combattre et de neutraliser les effets délétères des ERO, diverses stratégies antioxydantes existent, soit en augmentant les défenses enzymatiques antioxydantes endogènes, soit en renforçant les défenses non enzymatiques par des moyens diététiques ou pharmacologique (Dontha, 2016). Les principales enzymes antioxydantes sont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX). Les antioxydants non-enzymatiques renferment des substances endogènes comme le glutathion, la bilirubine l'acide urique et des substances exogènes apportées par l'alimentation comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols (Pincemail *et al.*, 2002).

Devant l'augmentation considérable du nombre pathologies impliquées par le stress oxydant et les effets néfastes des antioxydants synthétiques, de nombreux chercheurs à travers le monde, se sont orientés vers la recherche de composants naturels d'origine végétale ou même animale.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif essentiel est d'évaluer l'activité antioxydante de la bave d'un escargot comestible *Helix aspersa*.

# Matériel et Méthodes

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel animal

Le matériel animal étudié est *Helix aspersa*, c'est un mollusque gastéropode, pulmoné terrestre, communément connu sous le nom petit gris. La systématique d'*Helix aspersa* est la suivante (Bonnet *et al.*, 1990).

**Règne :** Animalia.

**Embranchement :** Mollusca.

**Classe :** Gastéropode.

**Sous-classe :** Pulmoné.

**Ordre :** Stylomatophora.

**Super-famille :** Helicacea.

**Famille :** Helicidae.

**Sous famille :** Helicinae.

**Genre :** *Helix*.

**Espèce :** *Helix aspersa*.

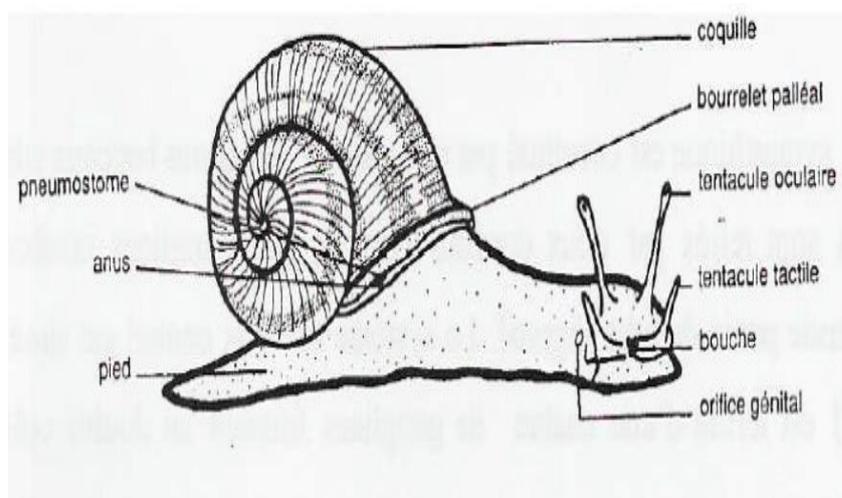


**Figure 1:** *Helix aspersa* (Original, 2023).

Les escargots (*Helix aspersa*) sont achetés en mars 2023 au niveau de la wilaya d'Alger, ils sont identifiés par Dr. Merzouki Youcef (zoologiste à l'université de Bordj Bou Arreridj) en se basant sur les caractéristiques morphologiques.

### 1.1.1. Morphologie d'*Helix aspersa*

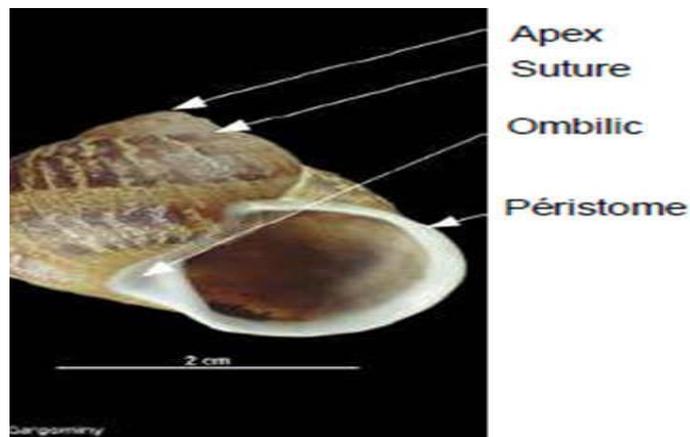
La tête *Helix aspersa* dispose, généralement, de deux paires de tentacules rétractiles. Dans la partie supérieure, la première paire de «cornes» abrite les yeux mais la vue est un sens peu utilisé. Dans la deuxième paire de tentacules il y a un organe olfactif et tactile (épithélium) qui est en revanche très utilisé par l'escargot (Michel *et al.*, 1979). L'escargot rampe grâce à son pied musculueux ventral, par des ondes de contraction se propageant de l'arrière vers l'avant à une vitesse constante. La masse viscérale est enveloppée par le manteau et totalement enfermée dans la coquille (Bonnet *et al.*, 1990).



**Figure 2:** Morphologie d' *Helix aspersa* (Bonnet *et al.* ,1990).

*Helix aspersa* possède une coquille globulaire (hauteur: 25 - 35 mm, diamètre: 25 -40 mm) avec 5 à 4,5 spires. La coquille avec des lignes de croissance irrégulières est brillante à brun foncé avec jusqu'à cinq ceintures tachetées (Nicolai, 2010). Elle est formée d'une seule pièce enroulée en hélice d'un cône très allongé. L'ouverture de la coquille est bordée par le péristome, et le sommet est l'apex. L'enroulement est dextre (Dans le sens des aiguilles d'une montre) et se fait autour d'un axe creux, la columelle autour de laquelle s'attache le muscle rétracteur du pied

(Muscle columellaire), cet axe débouche à l'extérieur par un petit orifice, l'ombilic encerclé par le dernier tour de la coquille (**Boue et Chanton, 1978**).



**Figure 3:** Coquille d'*Helix aspersa* ([www.inpn.mnhn.fr](http://www.inpn.mnhn.fr)).

### 1.1.2. Entretien des escargots

Les escargots ont été mis dans un endroit qu'on peut nommer escargotiers (cage en plastique ventilé). Dans un endroit humide et aéré avec une nourriture basée sur les feuilles d'arbres, de la salade, carottes, et de l'eau.



**Figure 4:** Escargots *Helix aspersa* (Originale, 2023).

## 1.2. Matériels de laboratoire

### 1.2.1. Produits chimiques

- Méthanol.
- DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle).
- Acide linoléique.
- $\beta$ -carotène.

- BHT (le butylhydroxytolène).
- Chloroforme.
- Tween

### 1.2.2. Appareillage :

- Balance de précision.
- Agitateur magnétique.
- Spectrophotmètre UV-visible.
- Micropipette.
- Centrifugeuse
- Vortex
- Becher.
- Ballon a fond.

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction de la bave

L'extraction de la bave des mollusques est réalisée selon le protocole décrit par Hayashida et da siliva(2021).

#### Protocole

Les escargots sont gardés sans nourriture avant l'extraction du mucus. Ils sont soumis à un choc thermique qui consiste en l'immersion de chacun dans l'eau froide ultra-pure. Par la suite, le mucus obtenu en grattant le corps à l'aide d'une spatule en bois. Le volume de la bave récupérée est sa densité sont déterminés. La bave est ensuite conservée dans un récipient stérile à -10° C jusqu'à son utilisation.

## 3. Etude de l'activité antioxydante

### 3.1. Piégeage du radical DPPH

Pour étudier l'activité anti radicalaire de la bave *d'Helix aspersa*, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri et *al* (2005) avec quelques modifications.

## Principe

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphenyl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphenyl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Atoui *et al.*, 2005 ; Majhenic *et al.*, 2007).

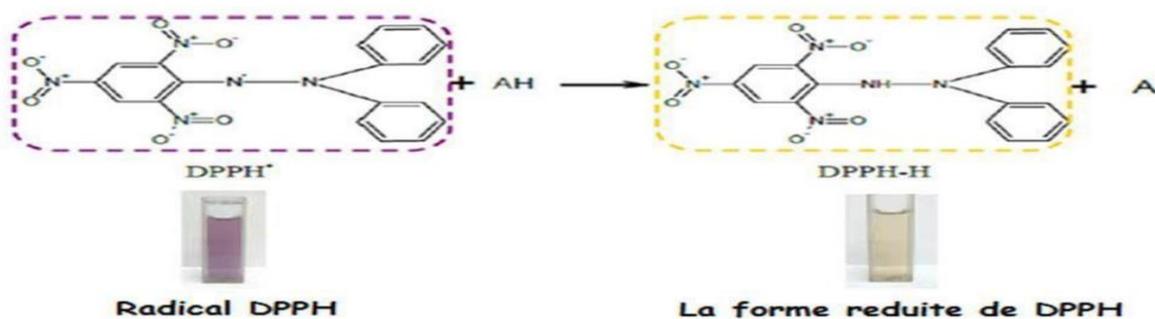


Figure 5: Réduction du radical DPPH (Molyneux ,2004).

## Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. La solution de l'extrait de la bave est ajoutée à 1000 µl de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et le méthanol sont mesurés à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{d'activité anti radicalaire} = \left[ \frac{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon}}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle}} \right] \times 100$$

### 3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée selon la méthode de Kartal *et al* (2007) avec certaines modifications.

#### Principe

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$  carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est mesurée à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$  carotène.

### Mode opératoire

L'émulsion de  $\beta$ -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 2 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25  $\mu$ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé par l'air, ensuite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. La solution de la bave ou d'antioxydants de référence (BHT) solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 $\mu$ l de méthanol) est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 0 heure, 24 heures et 48 heures.

Les pourcentages d'inhibition de blanchissement de  $\beta$ -carotène ont été calculés par la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs E t=48h} - \text{Abs C t=48h})}{(\text{Abs C t=0h} - \text{Abs C t=48h})} \times 100$$

**Abs E t=48h** : Absorbance de l'échantillon à T = 48 h

**Abs C t=48h** : Absorbance du contrôle négatif à T= 48h

**Abs C t=0h** : Absorbance du contrôle négatif à T = 0h

# Résultats et discussion

L'extraction de la bave à été effectuée par choc thermique et stimulation des glandes sécrétrices par une spatule en bois, pour avoir une quantité suffisante de mucus, deux extractions séparées ont été réalisées, les deux extractions permettent de récupérer un liquide visqueux, translucide de couleur jaune verdâtre.



**Figure 6:** La bave d'*Helix aspersa* (Originale, 2023).

La quantité et la densité de la bave de chaque extraction sont représentées dans le tableau suivant:

**Tableau I:** La quantité et la densité de la bave de l'espèce *Helix aspersa*

Nombre d'extraction	Méthode de Récupération	Rendement (ml)	Densité (g/ml)
1	Choc thermique	60	1,3
2	Choc thermique	28	1,5

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de vingt-neuf escargots permet de récupérer 60 ml de mucus dans la première extraction et 28 ml, presque la moitié dans la deuxième

extraction. Cela s'explique que la répétition de la stimulation des escargots diminue le taux de la sécrétion.

D'après la bibliographie, une température trop basse (inférieure à 7°C en hiver) entraîne l'hibernation des escargots, celle-ci se caractérise par un état de vie ralenti durant lequel le métabolisme des escargots est diminué (**Laurent et al., 1984 ; AGRO-SERVICE, 2004 ; Larba, 2014**).

la densité de la bave est calculée en se basant sur sa masse volumique, les résultats obtenus révèlent que la densité moyenne du mucus *Helix aspersa* des deux extractions est d'environ 1,45 g/ml.

Gugliandolo et ses collaborateurs (2021), ont étudié les propriétés physico-chimiques du mucus d'*Helix aspersa*. Ils ont trouvé une densité de 1,02 g/ml inférieure à celle obtenue.

La densité de la salive d'escargot est liée à sa composition chimique. Le mucus est constitué de plusieurs composants comme indiqué dans la bibliographie. Il contient des glycoprotéines telles que mucine, achacin. Il contient 90% à environ 99,7% d'eau (**Denny, 1983**).

Nantarat et son équipe (2019) ont déterminés les propriétés physiques du mucus de deux espèces d'escargot *Lissachatina fulica* et *Pomacea canaliculata*, ils ont trouvés que le mucus de *L. fulicata* est très visqueux tandis que *P. canaliculata* est un liquide légèrement blanc avec une faible viscosité.

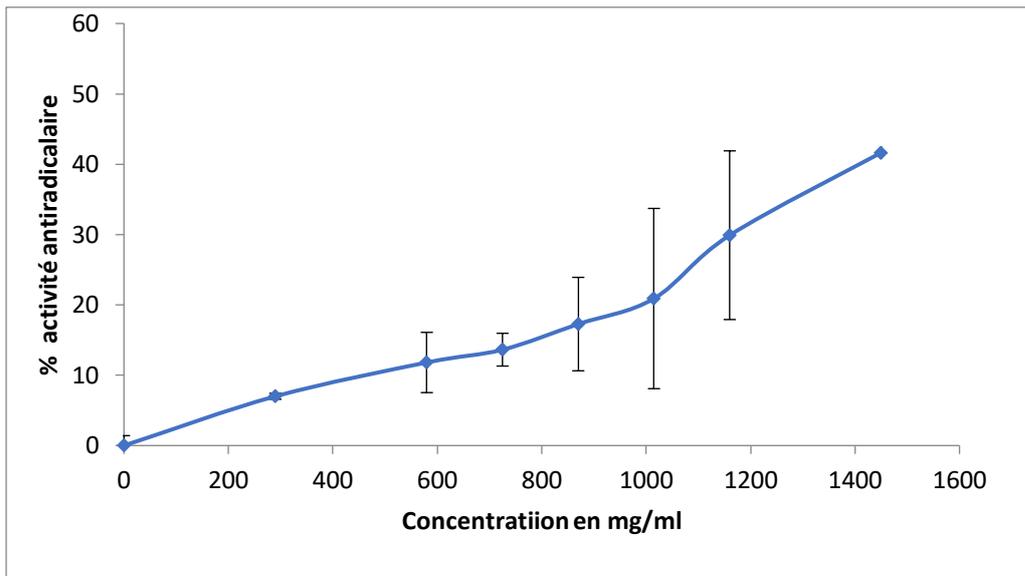
### 1. Test de l'activité antioxydant

#### 1.1. Piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait étudiée vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517nm.

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un réactif violet qui se transforme en jaune si l'hydrogène de l'antioxydant transfère au radical DPPH (**Kao et al., 2019**).

Le profil d'activité antiradicalaire obtenu est présenté dans la **figure 7**.



**Figure 7:** Activité antiradicalaire de la bave d'*Helix aspersa*

Le résultat obtenu montre que la bave possède une activité antiradicalaire dose dépendante. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de la bave et atteint une inhibition maximale de 41,63%

Kostadinova et ses collègues (2018) ont évalué le potentiel antioxydant des fractions peptidiques obtenues à partir du mucus (*Helix aspersa*) sur le radical DPPH. Ils ont séparé les composés bioactifs du mucus en quatre fractions avec des poids moléculaire différents (PM) : Fraction 1 (composés avec PM<5KDa) et Fraction 2 (composés avec PM<10KDa) et Fraction 3 (composés avec PM<20KDa) et Fraction 4 (PM entre 10-30 KDa.) Ils ont trouvé que le mucus a une activité antioxydante et que la fraction avec PM inférieur de <5KDa présente un meilleur potentiel antiradicalaire avec un % d'inhibition maximale 82,42% par rapport aux autres fractions.

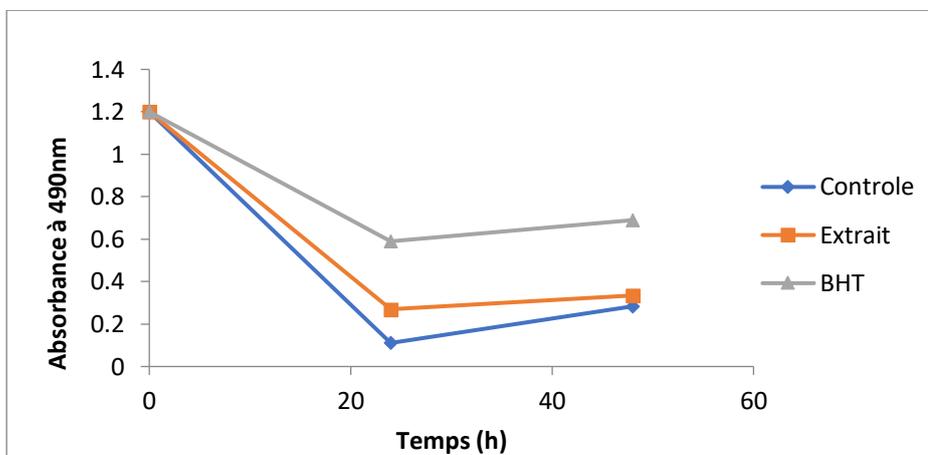
Chinaka et ses collaborateurs (2021) ont évalués l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de mucus *Achatina fulica* (escargot géant africain). Leur résultat montre que le mucus de cette espèce a une activité antioxydante.

L'activité antioxydante de mucus d' *Helix aspersa* est due à la présence de vitamine A, E, C, l'allantoïne qui est connue par ces propriétés antioxydantes (**Guskov et al., 2002**). Le mucus contient probablement des polyphénols provenant de l'alimentation des escargots.

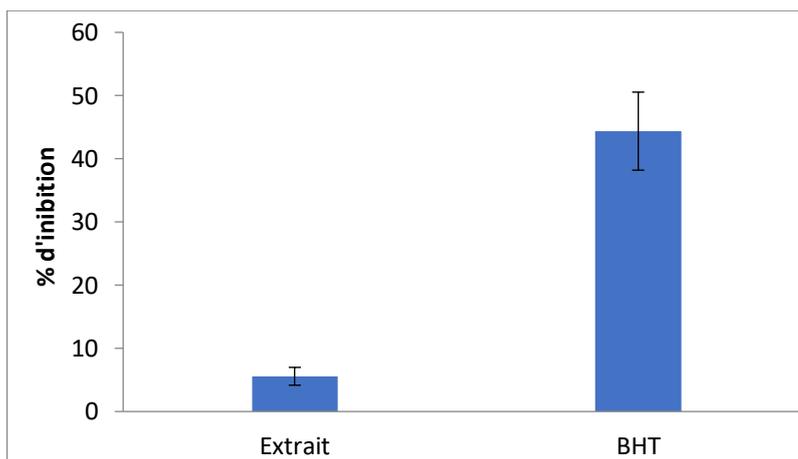
### 1.2 Test de blanchissement du B- carotène

Dans ce test, la capacité antioxydante de la bave *d Helix aspersa* est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et de la formation des hydro peroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique, qui attaquent simultanément le  $\beta$ -carotène et ayant conduisant au blanchiment du  $\beta$ -carotène et la disparition de sa couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. (Kadri *et al.*, 2011).

La cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène en absence et en présence l'extrait de la bave *d'Helix aspersa* de l'antioxydant standard (BHT) et les activités antioxydantes relatives sont représentées dans les **Figures 8 et 9**



**Figure 8:** La cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490nm en absence et en présence de la bave *d'Helix aspersa* et de BHT.



**Figure 9:** Le pourcentage d'inhibition de blanchissement de la  $\beta$ -carotène de l'extrait de la bave *d'Helix aspersa* et le BHT.

Les résultats obtenus montrent que la bave possède une très faible activité antioxydante qu'on peut dire négligeable (6%) par rapport au BHT est d'environ (44 ,37%).

La faible activité de la bave s'explique probablement par sa richesse en substance hydrophile tel que les mucines, une famille de protéines fortement glucosylées, achacine sont des composants impliqués dans l'activité antimicrobienne du mucus d'escargot (**Cilia et Fratini, 2018**). Collagène est une protéine qui confère aux tissus une résistance mécanique en l'étirant et l'acide glycolique aide à détruire les bactéries et stimule la production de collagène (**Bonnemain, 2003**).

Selon Diouf et al (2009), les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes importantes dans test de blanchissement de  $\beta$ - carotène car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection de lipides.

Conclusion

Les escargots se distinguent par la présence de plusieurs glandes spécialisées dans la production de mucus qui contient de nombreux composants ayant des activités différentes utilisés dans divers domaines comme la médecine, et le secteur cosmétique.

Les résultats permettent de retirer les conclusions suivantes :

-L'extraction de la bave d'*Helix aspersa* par choc thermique et la répétition de la stimulation affecte la production du mucus chez l'escargot et réduit le rendement.

-Le potentiel anti radicalaire a été déterminé par la méthode de réduction du radical DPPH et les résultats montrent que la bave possède une activité considérable, par contre la bave possède une activité négligeable dans le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène.

-le double comportement de la bave dans ces deux tests antioxydant s'explique par sa richesse en composés hydrophile par rapport aux composés hydrophobes.

Ces résultats pourraient être intéressants pour des études complémentaires visant à mieux évaluer l'activité antioxydante de la bave ainsi que d'autres activités.

# Références Bibliographiques

- AGRO-SERVICE., 2004.** L'élevage d'escargot, Etude monographique. Rapport final. Tunis
- Bonnemain, B. (2003).** Hélices et médicaments: l'escargot au service de la santé depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours. *Revue d'histoire de la pharmacie*, 91(338), 211-218.
- Bonnet J.C., Aupinel P. et Vrillon J.L., 1990.** L'escargot *Helix aspersa* : biologie-élevage.
- Boue.H et Chanton .R. 1978.** Zoologie, Tome I: Invertébrés. Edition Doin (Paris), pp 82-92.
- Chinaka, N. C., Chuku, L. C., George, G., Oraezu, C., Umahi, G., & Orinya, O. F. (2021).** Snail slime: evaluation of anti-inflammatory, phytochemical and antioxidant properties. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 13(1), 8-13.
- Cilia, G., & Fratini, F. (2018).** Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug mucus. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 15(3), 20170168.
- Cobbinah, J. R., Vink, A., & Onwuka, B. (2008).** *L'élevage d'escargots: Production, transformation et commercialisation.* Agromisa.
- Denny, M. (1983).** Molecular biomechanics of molluscan mucous secretions. In *Metabolic biochemistry and molecular biomechanics* (pp. 431-465). Academic Press
- Dontha, S. (2016).** A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 14-32.
- Ellijimi, C., Hammouda, M. B., Othman, H., Moslah, W., Jebali, J., Mabrouk, H. B., ... & Srairi-Abid, N. (2018).** *Helix aspersa maxima* mucus exhibits antimelanogenic and antitumoral effects against melanoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 871-880.
- Etim, L. B., Aleruchi, C., & Obande, G. A. (2016).** Antibacterial properties of snail mucus on bacteria isolated from patients with wound infection. *British Microbiology Research journal*, 11(2), 1-9.
- Gentili V, Bortolotti D, Benedusi M, et al (2020).** *Helix Complex* snail mucus as a potential technology against O3 induced skin damage. *PLoS One*, 15, e0229613
- Hatuikulipi, T., Kouachi, M., Bouchetob, L. E., Naimi, D., Bp, E., & Naimi, D. (2016).** Preventive effect of *Helix aspersa* slime against experimentally chemo-induced colitis in rat. *Der Pharmacia Lettre*, 8, 200-6.
- Hayashida, P. Y., & da Silva Júnior, P. I. (2021).** *Limacus flavus* yellow slug: bioactive molecules in the mucus. *bioRxiv*, 2021-05.

- Heusser, S., & Dupuy, H. G. (2011).** Synthèse de la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les Gastéropodes Pulmonés (I) Eléments d'histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*. *Folia Chonchiliologica*, 10, 3-25.
- Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(19), 3908-3914.
- Kalam, S., Singh, R., Mani, A., Patel, J., Naem, KF., & Pandey, A. (2012).** Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, 1: 18-34.
- Kao, C. J., Chou, H. Y., Lin, Y. C., Liu, Q., & David Wang, H. M. (2019).** Functional analysis of macromolecular polysaccharides: whitening, moisturizing, anti-oxidant, and cell proliferation. *Antioxidants*, 8(11), 533.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. (2007).** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*. 100: 584–589.
- Kostadinova, N., Voynikov, Y., Dolashki, A., Krumova, E., Abrashev, R., Kowalewski, D., ... & Dolashka, P. (2018).** Antioxidative screening of fractions from the mucus of garden snail *Cornu aspersum*. *Bulgarian Chemical Communications*, 50, 176-183.
- Laurent J., Deray A. 1984.** Influence de la photopériode, du degré d'hétérogénéité de la population sur la dynamique de croissance et la maturité sexuelle de l'escargot *Hélix aspersa*. *C. Royal Society of Biology*. 178: 421-44.
- Majhenic, L., Kerget, M.S., & Knez, Z. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258-1268.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*. 89: 411-420.
- McDermott, M., Cerullo, A. R., Parziale, J., Achrak, E., Sultana, S., Ferd, J., ... & Holford, M. (2021).** Advancing discovery of snail mucins function and application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 734023.
- Michel, R. (1979).** L'élevage des escargots. Deuxième édition 1979 entièrement revue, complétée et actualisée. 11 : 13-29.
- Migdal, C., Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.

**Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

**Moncef, Z. (2014).** *Etude écophysiological de la reproduction de l'escargot terrestre Petit-Gris (Helix aspersa aspersa, Gastropoda: Stylommatophora; Helicidae) dans la région Nord-Est d'Annaba-Algérie*. these Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar).

**Nantarat, N., Tragoolpua, Y., & Gunama, P. (2019).** Antibacterial activity of the Mucus Extract from the Giant African Snail (*Lissachatina fulica*) and Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) against pathogenic bacteria causing skin diseases. *Tropical Natural History*, 19(2), 103-112

**Nicolai, A. (2010).** *The impact of diet treatment on reproduction and thermophysiological processes in the land snails Cornu aspersum and Helix pomatia*. these Doctoral dissertation, Université Rennes 1).

**Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002).** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233-239.

**Pitt, S. J., Graham, M. A., Dedi, C. G., Taylor-Harris, P. M., and Gunn, A. (2015).** Antimicrobial Properties of Mucus from the Brown Garden Snail *Helix Aspersa*. *British Journal o Biomedical Science*. 72, 174–181.

**Trapella C, Rizzo R, Gallo S, et al. (2018).** *Helix Complex snail mucus exhibits pro-survival, proliferative and pro-migration effects on mammalian fibroblasts. Scientific Reports*, 8, 1-10.

**Waluga-Kozłowska, E. W. A., Jasik, K., Wcisło-Dziadecka, D. O. M. I. N. I. K. A., Pol, P., Kuznik-Trocha, K. O. R. N. E. L. I. A., Komosińska-Vassev, K. A. T. A. R. Z. Y. N. A., ... & Zimmermann, A. (2021).** SNAIL MUCUS-A NATURAL ORIGIN SUBSTANCE WITH POTENTIAL USE IN MEDICINE. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 78(6).

<https://manonmmaa.wixsite.com>).

[www.mlle-agathe.fr](http://www.mlle-agathe.fr)).

[www.inpn.mnhn.fr](http://www.inpn.mnhn.fr)).