الـجمهورية الـجزائرية الـديمقراطية الـشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي
Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi 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 des Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de la bave et de l'hémolymphe de l'escargot *Helix aspersa*.

Présenté par :

HAMMA Loubna & LALAOUI Raouya

Soutenu le 10/06/2025, Devant le Jury :

Présidente :	Mme. ROUAIGUIA Nadia	MAA	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrante :	Mme. FATMI Widad	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Examinatrice :	Mme. MEZITI Asma	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2024/2025

Remerciments

Avant tout, nous adressons notre profonde gratitude à Allah, pour la force, la patience et la santé qu'il nous a accordées tout au long de ce parcours, et grâce à qui ce travail a pu aboutir.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Madame **ROUAIGUIA Nadia**, Présidente du jury, pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement notre encadrante, Madame **FATMI Widad**, pour son accompagnement, sa rigueur et ses précieux conseils tout au long de ce mémoire.

Nos remerciements vont également à Madame **MEZITI Asma** pour son attention et ses remarques constructives.

Nos remerciements s'adressent aussi à l'équipe du laboratoire de biochimie, notamment Madame **SAHLI Ismahane Sabrine**, **DJEMOUI SETTI Sabrina** et Monsieur **MAKHOUKH Nasreddine**, pour leur soutien technique.

Un grand merci à Monsieur **Merzouki Youcef** pour la fourniture des spécimens d'escargots.

Enfin, merci à toutes les personnes, de près ou de loin, qui nous ont aidées ou encouragées durant la réalisation de ce travail.

Dédicace



À moi-même,

À la personne que je suis devenue, à celle qui a persévéré, Ce mémoire est le fruit de ma patience et de mes efforts. Merci à moi.

À mes parents, ABDELAZIZ et NACERA, Les piliers de ma vie, mes modèles. Rien ne pourra exprimer l'immensité de ma reconnaissance envers vous.

À Mes sœurs, SARA, **SOUMIA**, **MOUFIDA** et **YOUSRA**, mes compagnes de vie Et à **mon unique frère, SLIMANE**, mon âme, mon équilibre, mon tout.

À mes nièces et neveux : **HOYAM ADEM Brahimi**, **AMIR TAMIME MELINA IDRIS Salmi**, **YACINE DJAWAD OUSSAID Bennameur**, **LOUDJAINE Atmani**, Votre innocence a illuminé mes journées et adouci mes fatigues.

J'offre ce succès à l'âme de **mon grand-père** et de **ma grand-mère** décédés, qu'Allah leur fasse miséricorde, **À ma grande-mère maternelle** que dieu la protège

À toute **la famille HAMMA** en particulier à mes oncles : **MESSAOUD, LAKHDAR** et **ABDESLEM,** je vous dédie aussi ce travail.

À toute **la famille FETTIS,** je vous dédie également ce travail.

À ma binôme, **LALAOUI RAOUYA,** merci Pour ta complicité, et ton engagement à mes côtés. Ce mémoire est aussi le tien, à **NADA,** merci pour ton aide.

À AMEL, merci pour ton soutien tout au long de ce parcours, pour ta présence précieuse du début à la fin, je vous dédie ce travail .

À toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin.



HAMMA LOUBNA……

Dédicace



À moi-même,

Merci à moi d'avoir été une femme patiente et forte, d'avoir persévéré, cru en mon rêve, et de ne jamais l'avoir abandonné.

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, **Rabah** et **Khalissa**, pour leur amour, leur patience et leurs sacrifices. Vous avez toujours été mon refuge, mon soutien et ma plus grande force. Que Dieu vous protège et vous récompense pour tout ce que vous avez fait pour moi.

À mes frères, **Moussa, Moutie Din** et à ma sœur, **Belkisse**, pour leur tendresse, leurs encouragements et leur présence rassurante.

À ma sœur **Yousra**, qui restera à jamais dans mon cœur.

À toute ma famille **Lalaoui**, en particulier à mes chères grand-mères **Aïcha** et **Turquiya**, à mon grand-père **Rabah** et mon grand-père décédé (**Mohamed**). Et à mon oncle **Lakhdar** et **Nour Eddine**. Merci pour votre amour pour leur soutien et leurs prières à chaque étape.

À mon très cher binôme, la belle, la patiente et la persévérante, **HAMMA Loubna**. Merci d'avoir partagé ce chemin avec moi, avec cœur, force et complicité. Ton soutien a fait toute la différence, et ce travail porte aussi ton empreinte.

Et à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Merci du fond du cœur.



LALAOUI RAOUYA……

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Matériel et Méthodes

1 Matériel 6

1.1 Matériel biologique 6

1.1.1 *Helix aspersa* 6

1.1.1.1 Morphologie d'*Helix aspersa* 7

1.1.1.2 Élevage des escargots 9

1.1.1.2.1 Conditions d'élevage 9

1.1.1.2.2 Nourriture 9

1.1.1.2.3 Entretient de l'élevage 9

1.1.2 Souches bactériennes 9

2 Méthodes 10

2.1 Extraction de la bave 10

2.1.1 Extraction par stimulation mécanique douce 10

2.1.2 Extraction par choc thermique au froid 11

2.2 Prélèvement de l'hémolymphe 12

3 Analyse phytochimique quantitatif 13

3.1 Dosage des polyphénols totaux 13

3.2 Dosage des flavonoïdes 14

4 Evaluation de l'activité antioxydante 15

4.1 Piégeage du radical DPPH 15

4.2 Pouvoir Réducteur du fer 16

5 Activité antibactérienne : Méthode de diffusion en puits 17

5.1 Préparation de l'inoculum 17

5.2 Préparation des boîtes de Pétri 17

5.3 Remplissage des puits 18

5.4 Incubation 18

Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction 20
2. Analyse phytochimique quantitative 23
2.1. Teneur en polyphénols totaux 23
2.2. Teneur en flavonoïdes totaux 24
3. Activité antioxydante 25
3.1. Piégeage du radial libre DPPH 25
3.2. Pouvoir réducteur du fer ferrique 28
4. Activité antibactérienne 30
Conclusion 32
Références bibliographiques
Annexes
Résumés

LISTE DES ABREVIATIONS

DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl.
EAA	Equivalant acide ascorbique.
EAG	Equivalant acide gallique.
EQ	Equivalant quercétine.
ERO	Espèces réactives de l'oxygène.
Fe2+	Ion ferreux.
Fe3+	Ion ferrique.
FeCl3	Chlorure de fer.
FRAP	Ferric reducing antioxydant power.
IC50	Concentration inhibitrice à 50%.
GPx	Glutathion peroxydase.
K3Fe (CN) 6	Ferricyanure de potassium.
Na2CO3	Carbonate de sodium.
SOD	Superoxyde dismutase.
TCA	Acide trichloroacétique.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: l'escargot *Helix aspersa* 1
Figure 2: *Helix aspersa* 6
Figure 3: Morphologie d'*Helix aspersa* 7
Figure 4: Coquille d'*Helix aspersa* 8
Figure 5: Entretient de l'élevage de *Helix aspersa* 9
Figure 6: Extraction de mucus d'escargot par stimulation mécanique 10
Figure 7: Extraction de mucus d'escargot par choc thermique 11
Figure 8: Prélèvement de l'hémolymphe de l'escargot *Helix aspersa* 12
Figure 9: Structure de base des flavonoïdes 14
Figure 10: Réaction de réduction du radical DPPH• 15
Figure 11: Réaction chimique du test FRAP 16
Figure 12: La bave d'*Helix aspersa* 20
Figure 13: l'hémolymphe de *Helix aspersa* 21
Figure 14: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits de *Helix aspersa*. 26
Figure 15: Activité scavenger des différents extraits de *Helix aspersa* à l'égard du radical DPPH**.** 26
Figure 16 : Variation de l'absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits de *Helix aspersa* 28
Figure 17: Pouvoir réducteur du fer ferrique des différents extraits d'*Helix aspersa* 29
Figure 18: activité antibactérienne de la bave et l'hémolymphe d'*Helix aspersa* 30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Classification systématique de l'espèce *Helix aspersa* 7
Tableau II: Rendement volumique et densité de la bave de *Helix aspersa* extraite par deux méthodes. 21
Tableau III: Volume de l'hémolymphe prélevé de *Helix aspersa*. 22
Tableau IV: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes 23

Introduction

Les escargots sont des mollusques gastéropodes terrestres appartenant à l'ordre des Stylommatophora, un groupe très diversifié comprenant environ 80 000 espèces, se classant juste après les arthropodes en termes de diversité. Leur morphologie, bien que variable, présente des caractéristiques communes : un pied musculaire ventral utilisé pour la locomotion, un manteau protégeant les organes internes, et une coquille recouvrant partiellement le corps **(Karas, 2009)**. Leur corps mou, non segmenté, est organisé en trois régions distinctes : la tête (dotée de tentacules et d'yeux pédonculés), la masse viscérale et le pied **(figure 1)**. L'épiderme, constamment humide chez les espèces terrestres, sécrète un mucus qui facilite les déplacements sur différents types de substrats **(Zaffour, 2014)**.

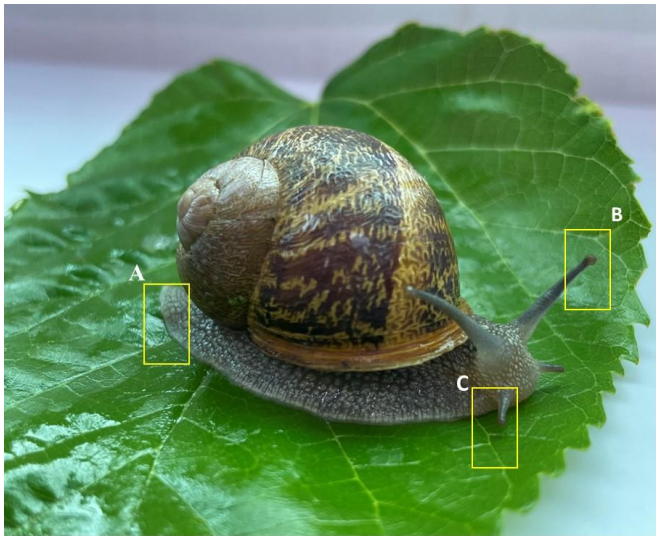


Figure 1: l'escargot *Helix aspersa* **(Originale 2025).**

(A) : pied. (B) : yeux. (C) : tentacules.

Parmi eux, *Helix aspersa*, ou « Petit-gris », est un escargot terrestre comestible de la famille des Helicidae **(Bonnet *et al.*, 1990)**, largement répandu dans les zones méditerranéennes algériennes. Il colonise divers habitats tels que les jardins, friches, haies et terres agricoles **(Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2000)**, où il est facilement récolté. Son régime alimentaire généraliste, typique des herbivores, lui permet de consommer une large variété de végétaux. Cette flexibilité alimentaire confère à *H. aspersa* un rôle écologique notable, notamment dans la structuration des communautés végétales et la dynamique des écosystèmes **(Milchunas et Lauenroth, 1993)**.

Depuis la préhistoire, les êtres humains consomment la viande d'escargot, appréciée pour sa richesse en protéines (12-16%) et en fer (45-50mg/kg), malgré sa faible teneur en lipides. Elle contient par ailleurs la quasi-totalité des acides aminés essentiels au bon fonctionnement de l'organisme humain **(Cobbinah *et al.,* 2008).**

Dans leur environnement naturel, les gastéropodes utilisent un mucus viscoélastique éphémère, essentiel à divers processus biologiques tels que la locomotion, l'adhérence, la nutrition, la reproduction, la lubrification et la défense contre les prédateurs **(Denny, 1983)**.

Chez les escargots, ce mucus, sécrété par des glandes pédieuses situées dans le pied, forme une couche visqueuse recouvrant l'ensemble du corps. Il s'agit d'un mélange complexe de composés bioactifs, reconnu pour ses propriétés bénéfiques, notamment dans le traitement des affections cutanées **(Claudio Trapella *et al.,* 2018 ; Nantarat *et al.,* 2019)**.

La composition du mucus d'escargot varie en fonction de l'espèce, de sa fonction biologique et du degré d'adhérence requis. Il est majoritairement composé d'eau (90 à 99,7 %) et renferme divers composés bioactifs, notamment des enzymes glycoprotéiques et des peptides antimicrobiens **(Denny, 1983 ; Waluga-Kozlowska *et al.,* 2021)**.

Ce mucus présente de nombreuses propriétés biologiques : activités antibactériennes, antioxydantes, anti-tyrosinasiques et antitumorales **(Aouji et *al.,* 2023)**. Les mucines, protéines fortement glycosylées, en sont les principales molécules fonctionnelles. Elles assurent notamment la protection des muqueuses, en particulier celle de l'intestin **(McDermott *et al.,* 2021)**, et pourraient, selon certaines études, jouer un rôle thérapeutique dans le traitement de cancers tels que le mélanome **(Ellijimi et *al.,* 2018)**.

D'autres protéines, comme le collagène, jouent un rôle structurel essentiel, notamment dans la réparation de la coquille. L'élastine, riche en proline et glycine, confère au mucus ses propriétés de souplesse et d'élasticité, utiles à la régénération cutanée, à la réduction des rides et des vergetures, ainsi qu'au soulagement des inflammations comme l'acné **(Rioux *et al.,* 2021)**.

Certaines glycoprotéines, telles que l'achacine, sont probablement responsables de l'activité antimicrobienne du mucus **(Cilia et Fratini, 2018)**. Enfin, des vitamines (A, E et C) et l'acide glycolique y contribuent également ; elles favorisent la régénération cellulaire, l'hydratation, la synthèse de collagène et l'élimination des agents pathogènes **(Bonnemain, 2003)**.

En plus du mucus, l'hémolymphe constitue un fluide biologique essentiel chez les escargots. Comparable au sang des vertébrés, elle assure le transport de l'oxygène, des nutriments et de diverses molécules dans un système circulatoire ouvert. Principalement composée d'eau, elle contient également des sels minéraux, glucides, protéines, lipides, enzymes, pigments respiratoires (notamment l'hémocyanine) et cellules immunitaires appelées hémocytes **(Machalowski et Jesionowski, 2021)**.

Riche en composés bioactifs, l'hémolymphe possède des propriétés biologiques et pharmacologiques notables. Elle est particulièrement reconnue pour son activité antioxydante, liée à la présence de peptides, d'enzymes, de composés phénoliques et de l'hémocyanine, qui joue également un rôle immunomodulateur **(Machalowski et Jesionowski, 2021)**. Ces caractéristiques en font un sujet d'intérêt dans la recherche biomédicale, notamment pour le développement de thérapies naturelles.

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité antioxydante des cellules. Ces radicaux incluent principalement des espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que le superoxyde, le radical hydroxyle, le NO·, ainsi que des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène. Les espèces réactives de l'azote (ERA) présentent des mécanismes similaires et participent également aux processus pathologiques liés au stress oxydatif **(Migdal et Serres, 2011 ; Kalam *et al.*, 2012)**.

Un antioxydant est une molécule qui neutralise les radicaux libres en stoppant leurs réactions en chaîne, sans devenir elle-même instable. Pour contrer les effets des espèces réactives de l'oxygène (ERO), l'organisme dispose de mécanismes enzymatiques (SOD, CAT, GPX) et non enzymatiques, incluant des composés endogènes (glutathion, acide urique) et exogènes (vitamines C et E, polyphénols) provenant de l'alimentation ou de traitements **(Pincemail *et al.*, 2002 ; Dontha, 2016)**.

La résistance croissante des agents pathogènes aux antimicrobiens représente un enjeu de santé publique mondial. Dans ce contexte, le développement de nouvelles thérapies est devenu prioritaire, et les mollusques apparaissent comme une source pharmacologique prometteuse **(Ulagesan et Kim, 2018)**.

Chez les invertébrés, l'immunité repose uniquement sur le système inné, dont l'efficacité compense l'absence de réponse adaptative. De nombreux peptides antimicrobiens présents dans leur hémolymphe montrent une large activité contre divers agents pathogènes. Les escargots, en particulier, sécrètent des mucines riches en protéines antibactériennes, contribuant à leur défense naturelle **(Aouji *et al.*, 2023)**.

Compte tenu de la recrudescence des pathologies liées au stress oxydatif ainsi qu'à la résistance bactérienne, la recherche s'oriente de plus en plus vers des alternatives naturelles présentant un potentiel biologique intéressant.

Dans le cadre de cette étude, l'objectif est d'évaluer les activités biologiques, en particulier les activité antioxydante et antimicrobienne, ainsi que d'effectuer une analyse phytochimique de la bave et de l'hémolymphe de l'escargot comestible *Helix aspersa*.

La première partie de ce mémoire constitue une introduction bibliographique synthétique portant sur les gastéropodes, le stress oxydatif et les infections microbiennes. Cette section mettra en lumière les connaissances actuelles sur ces thématiques, en soulignant les avancées scientifiques récentes ainsi que les lacunes identifiées dans la littérature.

La seconde partie, consacrée à l'étude expérimentale, présente le matériel utilisé, les méthodes de prélèvement des fluides biologiques du Petit-gris, ainsi que les protocoles d'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne. Les résultats obtenus y seront exposés et analysés de manière critique.

Enfin, une conclusion viendra synthétiser les principaux résultats de l'étude et proposer des perspectives de recherche permettant de compléter et d'approfondir les travaux réalisés.

Matériel et méthodes

Le travail a été réalisé au sein des laboratoires de biochimie et de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de de l'Univers, à l'Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arréridj.

1 Matériel

1.1 Matériel biologique

1.1.1 *Helix aspersa*

L'espèce *Helix aspersa* a été utilisée comme sujet biologique. Également connue sous les appellations de petit gris, *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum* et *Criptomphalus aspersus* **(figure 2)**, il s'agit d'un gastéropode terrestre à poumons, caractérisé par un corps mou et l'absence de squelette. Cette espèce ubiquiste, originaire des pays méditerranéens, est largement répandue dans le Nord-Est de l'Algérie **(Chevalier, 1977 ; Barker, 2001).** Selon **Muller, (1774)**, sa position systématique est présentée dans le **tableau 1**.



Figure 2: *Helix aspersa* **(Originale 2025).**

Les escargots ont été achetés au marché couvert, de la ville d'Alger, le 15 mars 2025. L'identification a été réalisée par Dr. Merzouki Youcef, zoologiste à l'Université de Bordj Bou Arreridj, sur la base des caractéristiques morphologiques.

Tableau I: Classification systématique de l'espèce *Helix aspersa* **(Muller, 1774)**

Règne	**Animalia**
Embranchement	Mollusca
Classe	Gastéropode
Sous-classe	Pulmoné
Ordre	Stylomatophora
Super-famille	Helicacea
Famille	Helicidae
Sous famille	Helicinae
Genre	*Helix*
Espèce	*Helix aspersa*

1.1.1.1 Morphologie d'*Helix aspersa*

Chez *Helix aspersa*, la tête comporte généralement deux paires de tentacules rétractiles. La paire supérieure, souvent appelée « cornes », porte les yeux, bien que la vision ne constitue pas le sens principal chez cette espèce. En revanche, la paire inférieure est dotée d'un épithélium à fonction olfactive et tactile, qui joue un rôle sensoriel important **(figure3) (Michel *et al.*, 1979).**

Le déplacement de l'escargot est assuré par le pied ventral, une structure musclée qui génère des ondes de contraction se propageant de l'arrière vers l'avant à une vitesse constante. La masse viscérale, quant à elle, est recouverte par le manteau et entièrement protégée à l'intérieur de la coquille **(Bonnet *et al.*, 1990).**

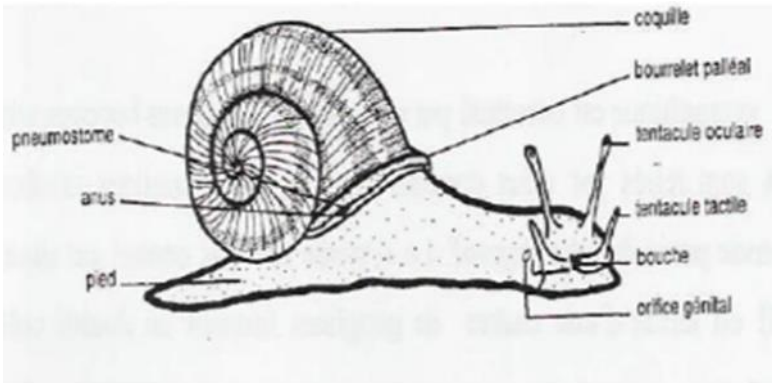


Figure 3: Morphologie d'*Helix aspersa* **(Bonnet et al.,1990).**

Helix aspersa possède une coquille globuleuse mesurant entre 25 et 35 mm de hauteur, et entre 25 et 40 mm de diamètre. Elle présente généralement entre 4.5 et 5 spires. Sa surface, marquée par des lignes de croissance irrégulières, est lisse, brillante, et de couleur brun foncé, souvent ornée de cinq bandes tachetées **(Nicolai, 2010).**

La coquille est constituée d'une seule pièce enroulée en spirale autour d'un cône allongé. L'ouverture est bordée par le péristome, tandis que le sommet est appelé apex. L'enroulement est dextre, c'est-à-dire orienté dans le sens des aiguilles d'une montre, autour d'un axe creux appelé columelle. C'est autour de cette columelle que s'insère le muscle rétracteur du pied, aussi nommé muscle columellaire. L'axe se prolonge vers l'extérieur par un petit orifice, l'ombilic, entouré par la dernière spire de la coquille **(figure 4) (Boue et Chanton, 1978).**

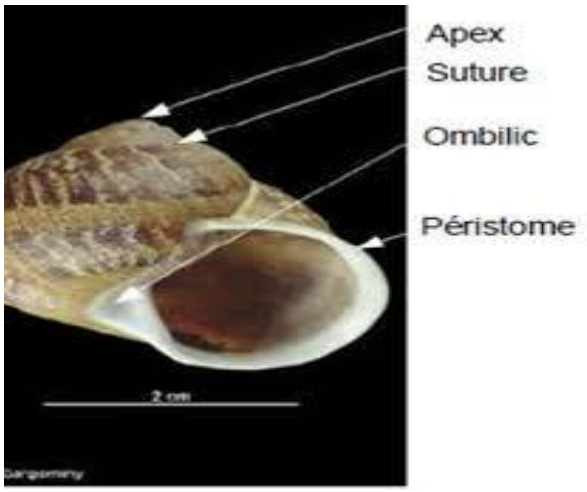


Figure 4: Coquille d'*Helix aspersa* **(www.inpn.mnhn.fr).**

1.1.1.2 Élevage des escargots

1.1.1.2.1 Conditions d'élevage

Les escargots sont maintenus dans les conditions naturelles de l'environnement du laboratoire, notamment la température, la lumière et l'humidité ambiantes. Les couvercles des boîtes en polyéthylène sont perforés afin d'assurer une aération adéquate

1.1.1.2.2 Nourriture

L'alimentation des escargots se compose de semoule et de feuilles de laitue. De l'eau est également mise à disposition pour prévenir la déshydratation.

1.1.1.2.3 Entretien de l'élevage

Les boîtes en polyéthylène sont entretenues trois fois par semaine : les matières fécales sont retirées et la nourriture remplacée **(figure 5).**



Figure 5: Entretien de l'élevage de *Helix aspersa* **(Originale, 2025).**

1.1.2 Souches bactériennes

Cinq souches bactériennes de référence ont été utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits testés. Elles ont été sélectionnées en raison de leur pertinence clinique et de la diversité de leur paroi cellulaire (Gram positif ou Gram négatif) :

- *Escherichia coli* ATCC 25922 : bacille à Gram négatif.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 : coque à Gram positif.
- *Bacillus cereus ATCC* 6633 : bacille à Gram positif, sporulé.
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 : coque à Gram positif.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 : bacille à Gram négatif.

Les souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arréridj. Elles ont été conservées à 4 °C sur gélose nutritive inclinée jusqu'à leur utilisation. Avant chaque essai, une réactivation a été effectuée dans un bouillon nutritif, suivie d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures.

2 Méthodes

2.1 Extraction de la bave

L'extraction du mucus chez *Helix aspersa* a été réalisée à l'aide de deux méthodes distinctes.

2.1.1 Extraction par stimulation mécanique douce

L'extraction manuelle du mucus repose sur une stimulation mécanique douce, sans recours à un traitement thermique, afin de collecter la bave de manière naturelle**.**

Avant l'extraction, les escargots sont mis à jeun afin de limiter les impuretés dans le mucus, puis soigneusement rincés à l'eau distillée. Ils sont ensuite placés dans un récipient propre et sec. Une stimulation légère est appliquée sur la face ventrale du pied (région pédieuse) à l'aide d'un coton-tige **(figure 6).** Le mucus sécrété est ensuite soigneusement récupéré à l'aide d'un instrument stérile. Le volume obtenu est mesuré et sa densité est déterminée. L'extrait est conservé dans un récipient stérile à –10 °C jusqu'à son utilisation **(Gugliandolo *et al.,* 2022).**



Figure 6: Extraction de mucus d'escargot par stimulation mécanique **(Originale, 2025).**

2.1.2 Extraction par choc thermique au froid

Cette méthode a été adaptée du protocole proposé par **Hayashida et Da Silva, (2021)**, avec quelques modifications tenant compte des conditions expérimentales.

Comme pour la méthode précédente, les escargots sont mis à jeun puis rincés à l'eau distillée. Chaque individu est ensuite immergé dans de l'eau froide ultra-pure afin de provoquer un choc thermique **(figure 7)**. Le mucus est alors récupéré en grattant doucement la face ventrale du pied à l'aide d'un coton-tige. Le volume collecté est mesuré, et sa densité évaluée. L'extrait est conservé dans un récipient stérile à une température de –10 °C jusqu'à son utilisation.



Figure 7: Extraction de mucus d'escargot par choc thermique **(Originale, 2025).**

2.2 Prélèvement de l'hémolymphe

L'hémolymphe de *Helix aspersa* a été collectée par perforation directe de la coquille à l'aide d'un scalpel stérile, au niveau d'un point spécifique situé sur la face inférieure. Cette incision permet une ouverture contrôlée, à travers laquelle l'hémolymphe s'écoule spontanément depuis les tissus mous sous-jacents, sans causer de dommages majeurs à l'animal **(figure 8).**

Le liquide ainsi obtenu est recueilli à l'aide d'une micropipette stérile et transféré immédiatement dans des microtubes contenant un anticoagulant (EDTA) pour prévenir la coagulation et l'agrégation cellulaire. Les échantillons sont maintenus sur glace pendant la manipulation, puis conservés à –10 °C jusqu'à leur utilisation. Cette méthode, adaptée des travaux de **Piana et Zannella (2024),** permet une extraction efficace et non létale de l'hémolymphe, tout en respectant le bien-être animal.



Figure 8: Prélèvement de l'hémolymphe de l'escargot *Helix aspersa* **(Originale, 2025).**

3 Analyse phytochimique quantitatif

3.1 Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols constituent une classe majeure de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures identifiées **(Martin et Andriantsitohaina, 2002).** Ces composés se distinguent par la présence d'au moins un noyau aromatique à six carbones, substitué par un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans d'autres fonctions chimiques (éthers, esters ou hétérosides) **(Balasundram *et al.*, 2006)**.

Principe

La quantification des composés phénoliques présents dans les mucus de l'escargot et l'hémolymphe de *Helix aspersa* a été réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, décrite par **Singleton et Rossi** (**1965),** avec quelques modifications. Le réactif utilisé est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), initialement de couleur jaune.

Cette méthode repose sur la capacité des composés phénoliques à subir une oxydation en présence de ce réactif, entraînant la formation d'un complexe coloré bleu à base d'oxydes de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques.

Mode opératoire

Un volume de 200 µl de chaque extrait a été mélangé séparément à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué au dixième. Ensuite, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % ont été ajoutés.

Les tubes ont été agités puis incubés à l'obscurité pendant 30 minutes afin de permettre le développement de la coloration. L'absorbance a été mesurée à 765.

Les teneurs en polyphénols totaux ont été déterminée à partir de l'équation de la droite de régression obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique **(annexe1).**

Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg E).

3.2 Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une sous-classe importante de composés phénoliques. Ils sont largement présents dans le règne végétal et se retrouvent dans presque toutes les parties des plantes. Ils sont abondamment présents dans les plantes et interviennent notamment dans la pigmentation, en produisant des pigments responsables d'une grande diversité chromatique **(Di Carlo *et al.*, 1999).**

Sur le plan structural, tous les flavonoïdes partagent un squelette commun dérivé de la benzo-γ-pyrone **(figure 9),** composée de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par une chaîne de trois atomes de carbone formant un hétérocycle oxygéné (cycle C) **(Karabin *et al.*, 2015).**

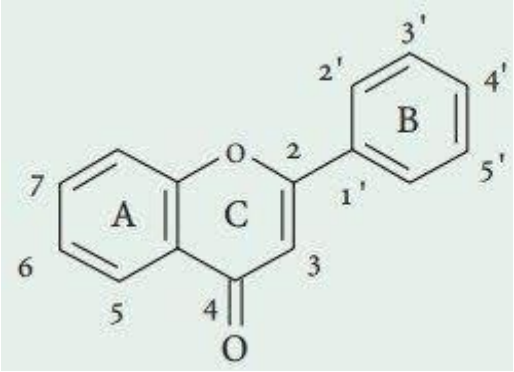


Figure 9: Structure de base des flavonoïdes **(Ghedira, 2005).**

Principe

La teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), décrite par **Jain et *al.*, (2011)**. Cette technique repose sur la formation de complexes entre les ions aluminium (Al^{3+}) et les flavonoïdes présents dans les échantillons, générant une coloration jaunâtre dont l'intensité est proportionnelle à leur concentration**.**

Mode opératoire

Un volume de 1 ml de chaque extrait ou de la solution standard de quercétine (préparés dans le méthanol) a été mélangé à 1 ml d'une solution d'$AlCl_3$ à 2 % (également préparée dans le méthanol). Après une incubation de 60 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 430 nm.

Les concentrations en flavonoïdes ont été déterminée à partir de l'équation de la droite de régression obtenue à l'aide de la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine **(annexe 2).** Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg E).

4 Evaluation de l'activité antioxydante

4.1 Piégeage du radical DPPH

Principe

L'activité antiradicalaire a été évaluée à l'aide du radical libre stable DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), selon la méthode décrite par **Blois (1958**). Cette technique repose sur la capacité des composés antioxydants à réduire le radical DPPH•. Cette réaction redox s'accompagne d'un changement de couleur caractéristique de la solution, passant du violet foncé au jaune pâle, indiquant la neutralisation du radical **(figure 10) (Habibou *et al.,* 2019)**

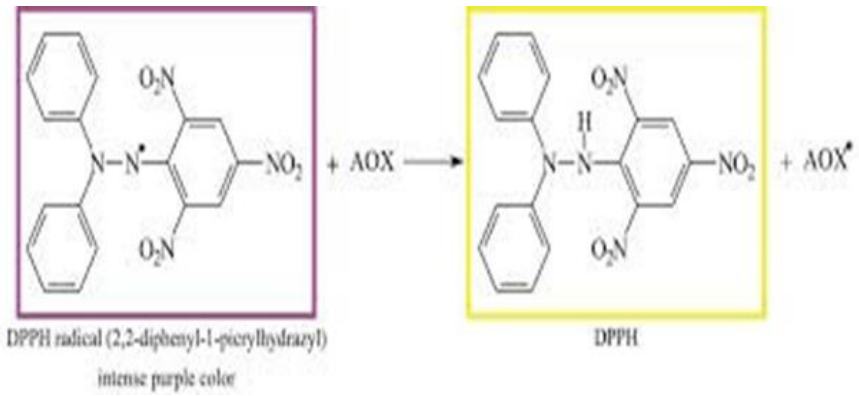


Figure 10: Réaction de réduction du radical DPPH• **(Becker *et al.,* 2019).**

Mode opératoire

Une solution de DPPH• a été préparée dans 20 ml de méthanol absolu et ajustée de manière à obtenir une absorbance initiale de 0,98 ± 0,02 à 517 nm. Un volume de 400 µl de chaque extrait, à différentes concentrations, a été ajouté à 1,6 ml de la solution de DPPH•.

Les mélanges ont été incubés à température ambiante, à l'obscurité, pendant 30 minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à 517 nm. La vitamine C a été utilisée comme standard de référence.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• a été calculé selon la formule suivante :

$$\textbf{\% de l'activité scavenger du radical DPPH•} = \frac{Ac-Ae}{Ac} \times 100$$

Où : **Ac** : Absorbance du contrôle. **Ae** : Absorbance d'échantillon.

4.2 Pouvoir Réducteur du fer

Principe

Le pouvoir réducteur a été évalué selon la méthode d'**Oyaizu (1986)** avec quelques modifications. Cette méthode repose sur la capacité des composés antioxydants à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure ($K_3Fe(CN)_6$) en fer ferreux (Fe^{2+}) **(figure11)**. Cette réaction est souvent corrélée au potentiel antioxydant d'un extrait. L'intensité de la coloration formée est mesurée à 700 nm.

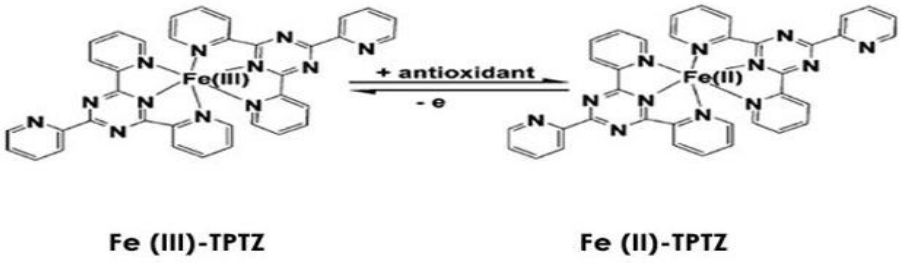


Figure 11: Réaction chimique du test FRAP **(Hmid, 2013).**

Mode opératoire

Un volume de 200 µl de solution de chaque extrait, à différentes concentrations, a été mélangé avec 500 µl de tampon phosphate (0,2 M, pH = 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1 %, préparée dans de l'eau distillée. Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes, puis 2,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % ont été ajoutés. Ensuite, 500 µl de la solution ont été prélevés et additionnés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 0,1 %.

L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par le solvant. L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence (**annexe 3**).

5 Activité antibactérienne : Méthode de diffusion en puits

Principe

La méthode de diffusion en puits sur gélose est couramment utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits naturels. Elle repose sur la diffusion de la substance testée à partir d'un puits creusé dans une gélose préalablement ensemencée, créant une zone d'inhibition proportionnelle à son efficacité antimicrobienne **(Valgas *et al.,* 2007).**

5.1 Préparation de l'inoculum

La revivification des souches bactériennes a été réalisée par repiquage successif sur gélose nutritive. Chaque souche a été cultivée sur gélose nutritive pendant 18 à 24 h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes isolées ont été mises en suspension dans une solution de NaCl à 0,9 %. Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO comprise entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à environ 10^8 bactéries/ ml **(Rodrigues et *al.,* 2005).**

5.2 Préparation des boîtes de Pétri

Des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) ont été ensemencées en surface avec 100 µl de la suspension bactérienne standardisée. Après un séchage à température ambiante, des puits de 6 mm de diamètre ont été creusés à l'aide d'un poinçon stérilisé **(Valgas *et al.,* 2007).**

5.3 Remplissage des puits

Chaque puits a été rempli avec 40 µl de l'extrait testé (bave), à deux concentrations : 300 mg/ml et 150 mg/ml, préparées dans un solvant approprié, ainsi qu'avec 40µl de surnageant de l'hemolymphe. Cette approche permet d'évaluer l'effet dose-dépendant des extraits sur la croissance bactérienne **(Valgas *et al.,* 2007).**

5.4 Incubation

Après une incubation de 24 heures à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition formées autour des puits ont été mesurés en millimètres à l'aide d'un pied à coulisse, fournissant ainsi une évaluation quantitative de l'activité antibactérienne **(Balouiri *et al.,* 2016).**

Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur standard (SE). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (version 19). Les comparaisons ont été effectuées à l'aide du test t de Student ou de l'analyse de la variance (ANOVA), selon le cas. Les graphiques ont été élaborés avec Microsoft Excel (version 2019). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative

Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction

L'extraction de la bave a été réalisée selon deux méthodes destinées à stimuler les glandes sécrétoires :

- Une stimulation mécanique douce à l'aide d'un coton-tige, appliquée à un groupe de dix escargots ;
- Un choc thermique à l'eau froide, appliquée à un autre groupe de dix individus.

Deux extractions ont été effectuées pour chaque groupe, une première, suivie d'une seconde après un intervalle de dix jours. Chaque procédure a permis de récupérer un liquide visqueux, translucide, dont la couleur variant du jaune au vert pâle **(figure12).**

Par ailleurs, l'hémolymphe a été prélevée par ponction directe chez dix escargots. Bien que les volumes recueillis soient modestes, ils se sont révélés suffisants pour les besoins expérimentaux. Ces différents prélèvements ont permis d'estimer à la fois le rendement volumique et la densité des sécrétions analysées **(tableaux 2 et 3).**

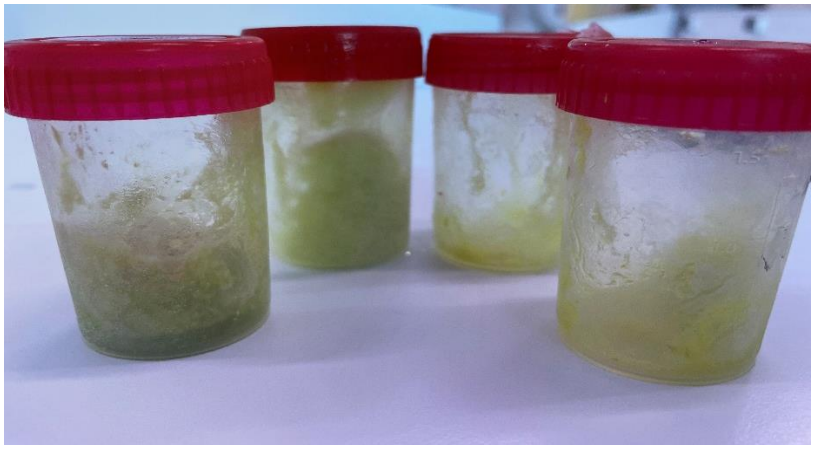


Figure 12: La bave d'*Helix aspersa* **(Originale, 2025).**

En comparaison à la bave, les quantités d'hémolymphe recueillies sont restées nettement inférieures, ne dépassant pas quelques millilitres par extraction **(figure 13).** Cette limitation est directement liée à la nature interne et circulante de ce fluide, dont le volume est restreint par la morphologie des gastéropodes.

D'après **Cilia et Fratini (2018),** l'hémolymphe représente environ 10 à 20 % du poids total d'un escargot, soit un volume estimé entre 1 et 2 ml par individu chez *Helix aspersa*. Malgré cette faible disponibilité, sa richesse en biomolécules fonctionnelles, notamment en hémocyanines, peptides antimicrobiens et enzymes antioxydantes lui confère un intérêt biologique majeur **(Pang et al., 2010 ; Wang et al., 2017).**



Figure 13: l'hémolymphe de *Helix aspersa* **(Originale, 2025).**

Tableau II: Rendement volumique et densité de la bave de *Helix aspersa* extraite par deux méthodes.

Méthodes d'extraction	Ordre d'extraction	Rendement (ml)	Densité (g/ml)
Stimulation mécanique douce	**Première**	30	1,3
	Secondaire (après10 jours).	26	1,3
Choc thermique (Eau froide)	**Première**	25	1,3
	Secondaire (Après 10 jours)	20	1,3

Tableau III: Volume de l'hémolymphe prélevé de *Helix aspersa.*

Méthodes d'extraction	Ordre d'extraction	Rendement (ml)
Incision de la coquille	**Première**	11
	Secondaire (après 20jours)	6

Les résultats obtenus montrent que la période de repos de dix jours entre deux extractions s'avère nécessaire pour permettre aux escargots de régénérer leur production de mucus, quelle que soit la méthode utilisée. En effet, une diminution modérée du rendement est observée après repos dans les deux cas, traduisant une récupération physiologique partielle **(Laurent *et al.*, 1984 ; Agro-Service, 2004).**

Ainsi, l'extraction naturelle, réalisée par stimulation mécanique douce sur dix escargots, a permis d'obtenir 30 ml de mucus lors de la première extraction, puis 26 ml après repos. De même, la méthode par choc thermique au froid appliquée à un autre groupe de dix escargots a généré un rendement de 25 ml lors de la première extraction, puis 20 ml après la même période de récupération. Ces résultats confirment que le repos est bénéfique, mais montrent également que la méthode d'extraction elle-même joue un rôle déterminant.

La méthode naturelle se révèle plus avantageuse, tant par son rendement initial plus élevé que par la stabilité de la production dans le temps. Cette efficacité s'explique par le caractère non agressif de la stimulation, qui respecte davantage les glandes sécrétrices **(Laurent et *al.*, 1984 ; Agro-Service, 2004)**. Plusieurs auteurs soulignent que la sécrétion de mucus dépend étroitement de l'état physiologique de l'escargot **(Denny, 1983)**, et que les méthodes douces, telles que le grattage, permettent de maintenir un bon rendement tout en préservant le bien-être animal **(Bautista *et al.*, 2014 ; Burlando *et al.*, 2020)**.

Ces observations rejoignent d'autres travaux montrant que les techniques plus stressantes, comme le choc thermique ou la stimulation chimique, réduisent plus rapidement la production et peuvent en altérer la qualité (**Larba, 2014**).

Contrairement à la bave, le prélèvement de l'hémolymphe ne peut pas être répété à court terme sur les mêmes individus, car ce fluide joue un rôle vital dans la régulation osmotique, le transport de l'oxygène et les réponses immunitaires **(Cilia et Fratini, 2018 ; De Oliveira et *al.,* 2021)**.

Par ailleurs, la densité de la bave, identique pour les deux méthodes (1,3 g/ml), témoigne d'une composition concentrée en composés organiques caractéristiques des mucus gastéropodiques : protéines, glycoprotéines, enzymes et mucopolysaccharides **(Drechsler *et al.,* 2006 ; Iguchi *et al.,* 2008).**

Cette concentration élevée confère au mucus des propriétés intéressantes, notamment antimicrobiennes, antioxydantes, et un bon pouvoir filmogène, comme l'ont montré plusieurs études, justifiant ainsi son usage en cosmétique et en biomédecine **(Burlando *et al.,* 2020).**

2. Analyse phytochimique quantitative

2.1. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été mesurée dans la bave et l'hémolymphe d'*Helix aspersa*, selon la méthode de Folin-Ciocalteu, et exprimée en µg d'équivalent acide gallique/mg d'extrait (y = 0,0063x) (**annexe 1, tableau 4**).

Tableau IV: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes.

Extrait	[Polyphénols] µg EAG/mg E	[Flavonoïdes] µg EQ/mg E
Bave extraite par stimulation mécanique douce	1,0476 ± 0,57	0,13 ± 0,05
Bave extraite par choc thermique	0,406 ± 0,15*	0,103 ± 0,7
Hémolymphe	1,298 ± 0,09	0,11 ± 0,1

(*) Différence très hautement significative par rapport à l'hémolymphe et la bave extraite par Stimulation mécanique ($p < 0.001$).

Les résultats montrent que l'hémolymphe présente la plus forte teneur en polyphénols, suivie de la bave obtenue naturellement, tandis que celle extraite par choc thermique à l'eau froide en contient le moins. Ces valeurs se révèlent proches à celles rapportées par **El-Mahmoudi *et al.,* (2023)** qui ont mesuré 0,132 mg/ml dans un extrait brut de bave et 1,467 ± 0,077 mg/g dans un extrait aqueux. Cette différence pourrait s'expliquer par des variations méthodologiques ou des facteurs biologiques tels que l'âge, l'alimentation ou l'environnement des escargots.

L'écart de la concentration en polyphénol entre les deux méthodes d'extraction de la bave peut s'interpréter par l'impact du stress. Le choc thermique, bien que non destructeur, induit une sécrétion rapide et réflexe, probablement moins riche en métabolites secondaires comme les polyphénols. En revanche, l'extraction naturelle, plus respectueuse du rythme physiologique de l'animal, favorise une production de mucus plus stable et biochimiquement riche. Ces constats rejoignent ceux de **Mahmoudi *et al.,* (2023)**, qui soulignent l'intérêt des méthodes douces pour préserver la qualité du mucus.

Quant à l'hémolymphe, sa teneur élevée en polyphénols (1,298 ±0,09 µg/ml) peut être liée à son rôle dans les défenses immunitaires et le transport des antioxydants, éléments clés dans la lutte contre le stress oxydatif et les infections.

2.2. Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes de la bave et d'hémolymphe a été évaluée selon la méthode de **Jain et al. (2011)**, et exprimée en µg équivalent quercétine/ml (y = 0,0305x) **(tableau 4).**

D'après les résultats obtenus, la teneur en flavonoïdes varie selon le type d'échantillon analysé. La bave extraite par stimulation présente la concentration la plus élevée (0,13 ± 0,05 µg EQ/mg), suivie de l'hémolymphe (0,11 ± 0,1 µg EQ/mg), puis la bave extraite par choc thermique (0,103 ± 0,7 µg EQ/mg), Ces données suggèrent que le mode d'extraction influe directement la stabilité et la récupération des métabolites phénoliques.

Par rapport aux données de la littérature, les teneurs obtenues demeurent relativement faibles. **Herman *et al.*, (2024)** ont mesuré 0,132 ± 0,002 mg EQ/g dans des extraits de chair de Helix aspersa Müller, une valeur comparable à celle observée dans notre bave naturelle. À l'inverse, **Zielińska *et al.*, (2024)** ont rapporté une teneur nettement plus élevée (77,62 ± 1,2 mg EQ/g) dans une bave enrichie en caroténoïdes, mettant en évidence l'influence déterminante de l'alimentation sur la composition biochimique.

L'hémolymphe présente une teneur modérée en flavonoïdes, légèrement inférieure à celle de la bave. Cette présence peut être attribuée à son rôle dans les mécanismes de défense physiologique, notamment par le transport de composés antioxydants impliqués dans la régulation du stress oxydatif.

3. Activité antioxydante

3.1. Piégeage du radial libre DPPH

L'activité antiradicalaire a été évaluée par le test DPPH, basé sur la réduction des radicaux libres et la baisse d'absorbance à 517 nm.

D'après les figures 14 et 15 les extraits issus de *Helix aspersa* ont présenté une activité antiradicalaire variable selon leur nature et la méthode d'extraction. L'hémolymphe a montré la meilleure efficacité (55,88 % d'inhibition, IC_{50} = 1795,85 ± 2,6 mg/ml), suivie de la bave obtenue par stimulation mécanique (51,58 %, IC_{50} = 1878,35 ± 1,8 mg/ml), puis de celle extraite par choc thermique (49,5 %, IC_{50} = 1944,37 ± 2,3 mg/ml).

En comparaison, l'acide ascorbique reste le plus puissant antioxydant testé (IC_{50} = 0,103 ± 1,3 mg/ml), servant ainsi de référence .

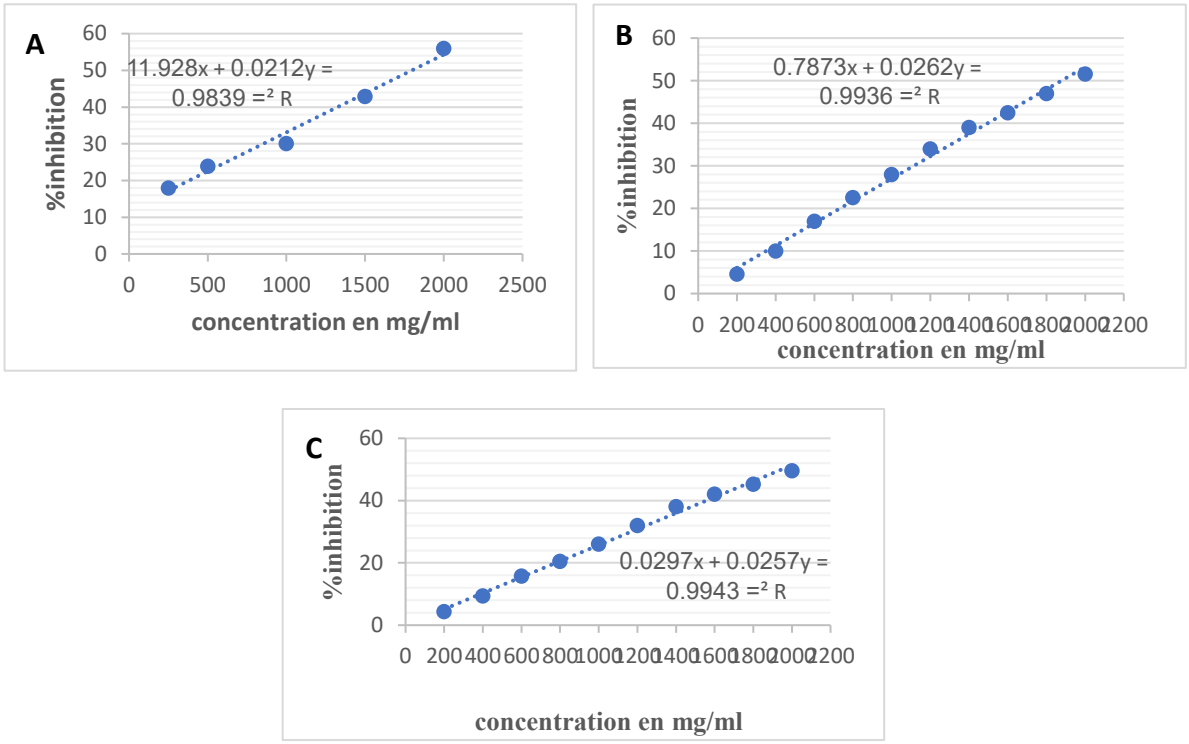


Figure 14: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits de *Helix aspersa*.

(A) : Hémolymphe **(B)** : Bave extraite par stimulation mécanique **(C) :** Bave extraite par choc thermique.

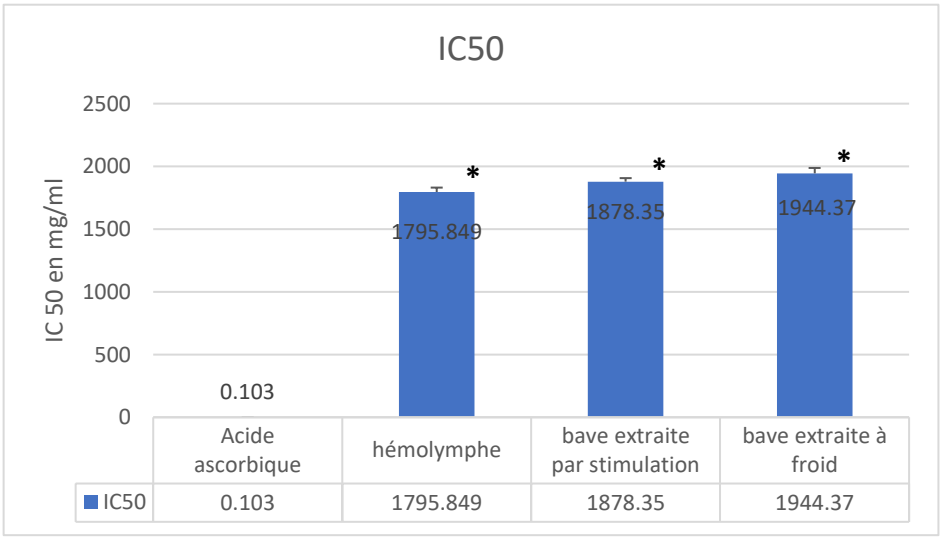


Figure 15: Activité scavenger des différents extraits de *Helix aspersa* à l'égard du radical DPPH.

(*) Différence très hautement significative par rapport à l'acide ascorbique ($p < 0.001$).

Les résultats obtenus pour l'activité antiradicalaire de l'hémolymphe sont en accord avec ceux de **Raynova *et al.,* (2015),** qui ont démontré les propriétés antioxydantes de l'hémocyanine chez Helix aspersa. Par ailleurs, l'activité mesurée pour la bave extraite par choc thermique est comparable à celle rapportée par **Abdessettar *et al.,* (2023)**, qui a observé un pourcentage d'inhibition de 41,63%.

La supériorité de l'activité antiradicalaire observé par l'hémolymphe s'explique par sa richesse en composés hydrosolubles antioxydants, notamment les polyphénols (1,298 µg EAG/mg) **(Rice-Evans *et al.,* 1997 ; Molyneux, 2004 ; Lawal *et al.,* 2015).**

D'autre part, la bave obtenue par stimulation douce présente une meilleure activité antiradicalaire, probablement en raison d'une meilleure préservation des molécules sensibles aux conditions extrêmes. À l'inverse, le choc thermique pourrait altérer la structure ou réduire la disponibilité de certains composés antioxydants, affectant ainsi leur efficacité.

3.2. Pouvoir réducteur du fer ferrique

Le pouvoir antioxydant a été évalué par la méthode FRAP **(Oyaizu, 1986),** qui mesure la capacité de réduction du fer. L'efficacité est exprimée par l'EC_{50} : plus elle est faible, plus l'activité antioxydante est élevée.

L'hémolymphe a montré le plus fort pouvoir réducteur (EC_{50} = 1031,67 ± 3,5 mg/ml), suivie de la bave extraite par stimulation douce (EC_{50} = 1206 ± 2,8 mg/ml), tandis que la bave issue du choc thermique affichait la plus faible activité (EC_{50} = 1742 ± 4,3 mg/ml) **(figure 16, 17).**

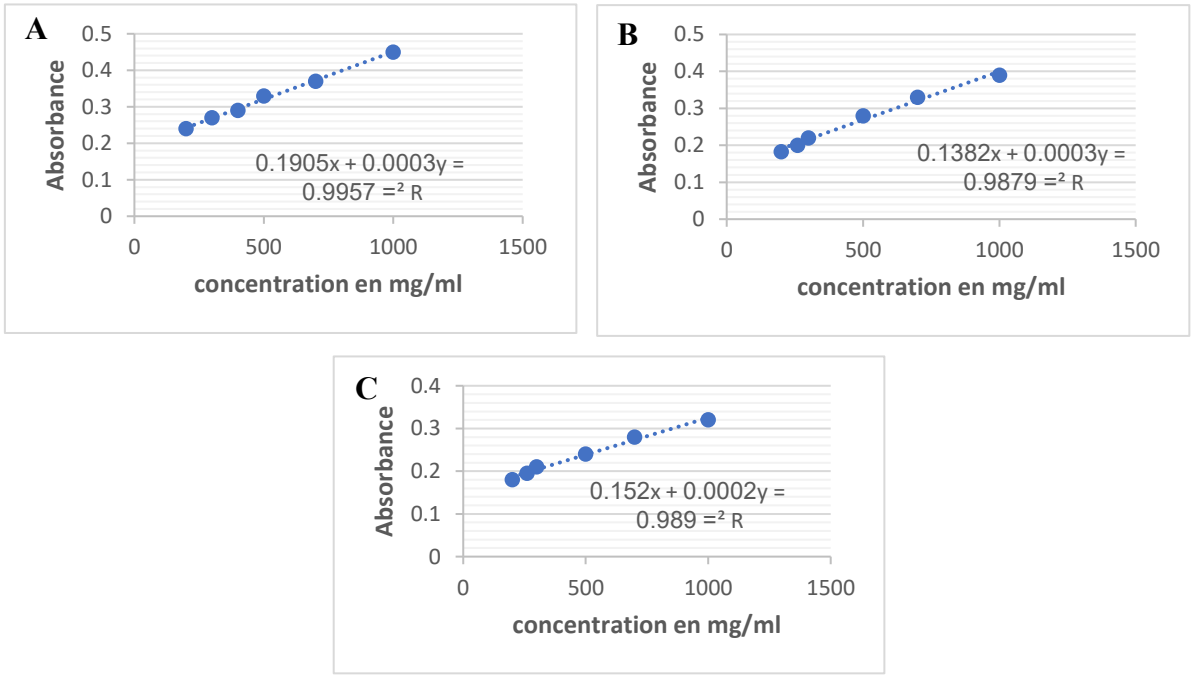


Figure 16 : Variation de l'absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits de *Helix aspersa.*

(A) : hémolymphe (**B)** : bave extraite par stimulation mécanique (**C**) : bave extraite par choc thermique.

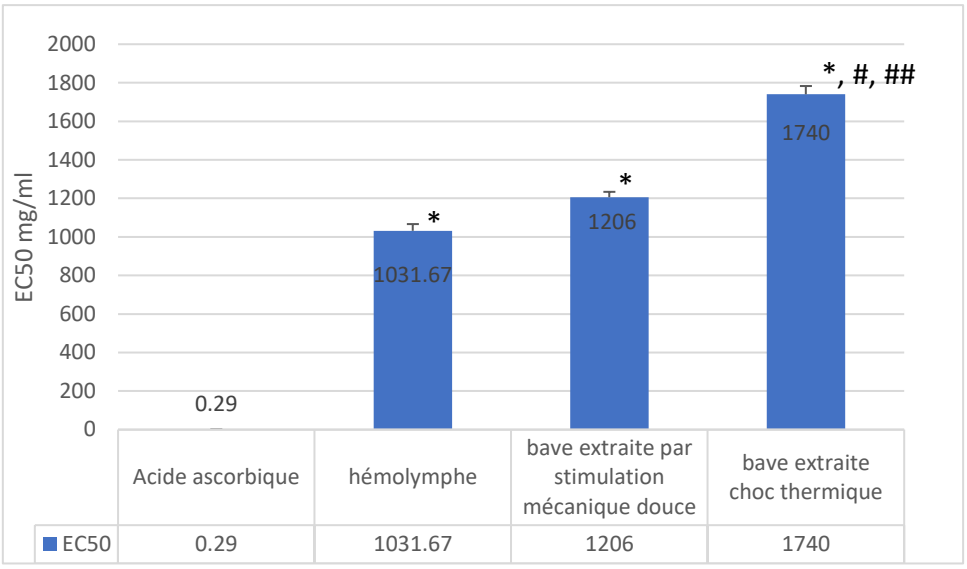


Figure 17: Pouvoir réducteur du fer ferrique des différents extraits d'Helix aspersa.

(*) Différence très hautement significative par rapport à l'acide ascorbique ($p < 0.001$).

(#) Différence significative par rapport à la bave extraite par stimulation mécanique ($p < 0.05$).

(##) Différence très hautement significative par rapport à l'hémolymphe ($p < 0.001$).

4. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de la bave et de l'hémolymphe de *Helix aspersa* a été évaluée par diffusion en puits contre cinq souches bactériennes standards. Aucun extrait, qu'il s'agisse de bave (500 et 1000 mg/ml) ou d'hémolymphe brute, n'a présenté de zone d'inhibition **(figure 18)**, indiquant une absence d'effet antibactérien dans les conditions testées. Cette inefficacité pourrait s'expliquer par une faible concentration ou l'inactivité des composés bioactifs sous forme brute, ainsi que par la viscosité du mucus, limitant leur diffusion dans la gélose **(El-Mohsen *et al.,* 2015).**

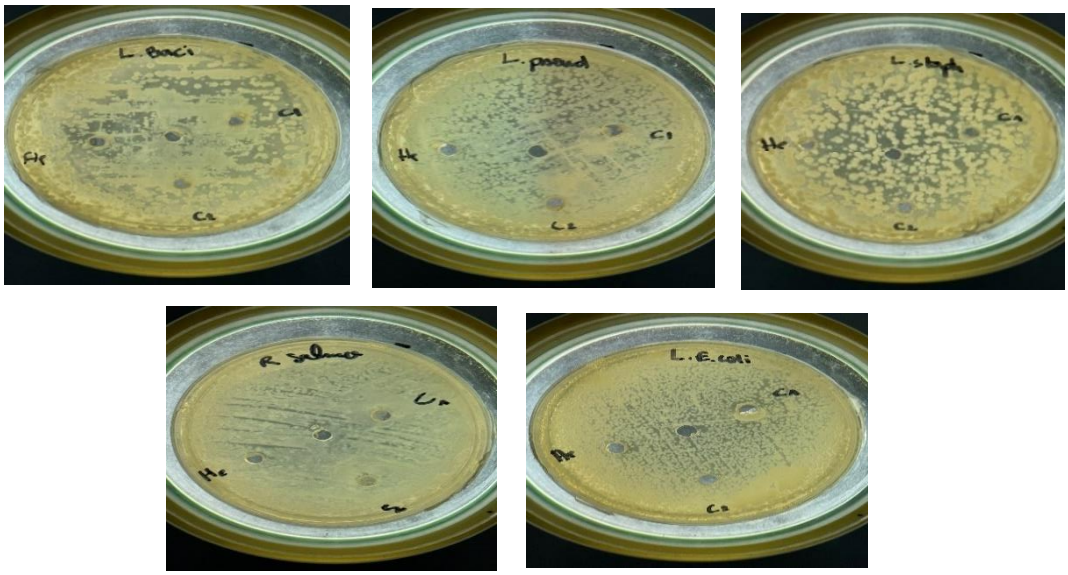


Figure 18: activité antibactérienne de la bave et l'hémolymphe d'*Helix aspersa*.

Où : C1 : Bave a concentration 500 mg/ml. **C2 :** Bave a concentration 1000 mg/ml.
H : Hémolymphe.

Ces résultats concordent avec ceux de **Lawal *et al.,* (2015) et Al Boussadia *et al.,* (2020),** qui ont montré l'inactivité des extraits aqueux bruts, contrairement aux extraits organiques. Des études antérieures **Pitt *et al.,* 2015 et Dolashka *et al.,* 2016)** ont cependant mis en évidence une activité antimicrobienne après purification ou concentration des protéines, soulignant l'importance du protocole d'extraction.

Des études ont montré que l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe et du mucus de *Helix aspersa* dépend de traitements spécifiques. **Dolashka *et al.*, (2016)** ont observé une activité significative après purification des hémocyanines, tandis que **Pitt *et al.*, (2015)** ont isolé des protéines antimicrobiennes actives (30–100 kDa) après séparation par taille. En revanche, notre protocole, utilisant des extraits bruts non purifiés, pourrait expliquer l'absence d'effet observé. Ainsi, des étapes de concentration ou de purification semblent indispensables pour révéler le potentiel antimicrobien réel de ces extraits.

Conclusion

Chez *Helix aspersa*, l'hémolymphe et la bave représentent deux sources biologiques distinctes riches en composés bioactifs, suscitant un intérêt croissant dans les domaines biomédical et cosmétique.

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de tirer les conclusions suivantes :

• La méthode d'extraction influence directement le rendement et la quantité de bave collectée ; la stimulation mécanique douce offre un meilleur rendement que le choc thermique.

• L'hémolymphe se distingue par une activité antioxydante nettement supérieure à celle des deux types de bave, en lien avec sa richesse en polyphénols totaux.

• La bave extraite naturellement montre une activité antioxydante modérée, meilleure que celle obtenue par choc thermique, soulignant l'importance des méthodes douces pour préserver les molécules sensibles.

• Aucun des extraits bruts testés n'a montré d'activité antibactérienne détectable, probablement en raison d'une faible concentration en principes actifs ou de l'absence de purification.

• Les propriétés antioxydantes observées, en particulier celles de l'hémolymphe, suggèrent un potentiel intéressant pour des applications naturelles, nécessitant toutefois des études approfondies.

Ces résultats constituent une base pour de futures recherches portant sur l'isolement des composés actifs de la bave et de l'hémolymphe de *Helix aspersa*, l'exploration d'autres activités biologiques, ainsi que leur valorisation potentielle dans les domaines pharmaceutique et cosmétique.

Références bibliographiques

A

Abdessettar, I., Ben Abd Allah, R. A., & Derradj, S. (2023). Évaluation de l'activité antioxydante de la bave d'Helix aspersa [Mémoire de Master, Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arreridj].

AGRO-SERVICE., 2004. L'élevage d'escargot, Etude monographique. Rapport final. Tunis

Al Boussadia, O., Beji, R. S., & Dhouib, A. (2020). Antibacterial activity of mucus and body extracts of Eobania vermiculata and Helix aspersa. African Journal of Biotechnology, 19(2), 83–90.

Aouji, M., Rkhaila, A., Bouhaddioui, B., Zirari, M., Harifi, H., Taboz, Y., Lrhorfi, L. A., & Bengueddour, R. (2023). Chemical composition, mineral profile, anti-bacterial, and wound healing properties of snail slime of Helix aspersa Müller. BioMedicine, 13(4), Article 2.

B

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C., Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-Forschung, 46(11): 1086-1089.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99(1), 191-203.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2), 71–79.

Barker, G.M., (2001). Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. The biologies of terrestrial molluscs, vol: (1), pp.139.

Bautista, A. R., Jiao, W. C., Cheng, S. H., & Huang, Y. X. (2014). Physicochemical and biochemical properties of snail mucus: Potential use in cosmetics and biomedicine. Journal of Molluscan Research, 30(2), 102–110.

Becker, M. M., Nunes, G. S., Ribeiro, D. B., Silva, F. E. P. S., Catanante, G., & Marty, J.-L. (2019). Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. Journal of the Brazilian Chemical Society, 30, 1108-1114.

Ben Slimane, N., et al. (2023). Antioxidant activity, biochemical composition and physicochemical properties of Helix aspersa Muller snail slime. ResearchGate.

Blois, M. S., (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature. 4617(181), 1119-1200.

Bonnemain, B. (2003). Hélices et médicaments : l'escargot au service de la santé depuis

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.

Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends in Microbiology, 19(8), 419–426.

Burlando, B., Cornara, L., & Pastorino, G. (2020). Snail mucus and its potential therapeutic applications. Biological Reviews, 95(3), 766–784.
l'Antiquité jusqu'à nos jours. Revue d'histoire de la pharmacie, 91(338), 211-218.

C

Chevallier, H., (1977).la variabilité de l'Escargot petit_Gris hélix aspersa Muller. Bulletin du museum d'Histoire Naturelle, PP425_442.

Cilia, G., & Fratini, F. (2018). Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug mucus. Journal of Complementary and Integrative Medicine, 15(3), 20170168.

Cobbinah J.C; Adri Vink; Ben Onwuka. 2008. L'élevage d'escargots : Production, transformation et commercialisation- Agrodok 47. Agromisia Foundation, Wageningen,
Première Edition, 82p.

D

De Oliveira, D. M., de Souza, A. S., & Vasconcelos, M. A. (2021). Hemolymph of mollusks: Composition, immunological function and potential applications. Fish & Shellfish Immunology, 114, 15–25.

Denny, M., 1983. Molecular biomechanics of molluscan mucous secretions. In: Hochachka,
P.W. (Ed.), The Mollusca - Metabolic Biochemistry and MolecularBiomechanics.
Academic Press, New York, pp. 431–465

Devalckeneer, A., et al. (2024). Metabolomic Prediction of Cadmium Nephrotoxicity in the Snail Helix aspersa maxima. Metabolites, 14(8), 455.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences, 65(4), 337-353.

Dolashka, P., Velkova, L., Stoyanova, A., & Voelter, W. (2016). Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from Helix aspersa. Protein and Peptide Letters, 23(4), 372–378.

Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. Asian Journal of Pharmaceutical and
Clinical Research, 9(2), 14-32.

Drechsler, M., Lobmann, R., Steinebrunner, L., & Köck, A. (2006). The rheological properties of snail mucus. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 48(1), 1–8.

E

**Ellijimi, C., Hammouda, M. B., Othman, H., Moslah, W., Jebali, J., Mabrouk, H. B., ... &
Srairi-Abid, N. (2018).** Helix aspersa maxima mucus exhibitsantimelanogenic and antitumoral effects against melanomacells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 101, 871-880.

El-Mahmoudi, A., Cherif, S., & Triki, M. (2023). Chemical composition and biological activity of Helix aspersa snail extracts. ACS Omega, 8(1), 10165–10172.

El-Mohsen, M. A., El-Shenawy, N. S., & Kassem, H. A. (2015). Antimicrobial potential and characterization of glycoproteins from mucus of the Egyptian land snail Eobania vermiculata. Journal of Coastal Life Medicine, 3(5), 370–377.

G

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytotherapie, 3(4), 162-169.

Gomot de Vaufleury, A., & Pihan, F. (2000). Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. Chemosphere, 40(3), 275–284.

Gugliandolo, E., Salamone, T., Licata, P., Crupi, R., & Di Rosa, G. (2022). Snail mucus filtrate reduces inflammation in canine progenitor epidermal keratinocytes (CPEK). International Journal of Molecular Sciences, 23(15), 8217.

H

Habibou, H. H., Idrissa, M., Khalid, I., Benjamin, O., & Rabani, A. (2019). Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Differents Organes de Detarium microcarpum Guill. & Perr. European Scientific Journal, ESJ, 15(12), Article 12.

Hayashida, P. Y., & da Silva Júnior, P. I. (2021). Limacus flavus yellow slug: bioactive molecules in the mucus. bioRxiv, 2021-05.

Herman, A., et al. (2024). Nutritional Composition, Antioxidant Activity of Helix aspersa Müller Flesh. Molecules, 28(17), 6323.

Hmid, I. (2013). Contribution a la valorisation alimentaire du grenadier Marocain (Punica Granatum L.). Caractérisation physicochimique et biochimique de leur jus. Thèse doctorat. L'Université d'Angers (France).

I

Iguchi, S. M., Hoshi, M., & Nikaido, O. (2008). Characterization of snail mucus as a moisturizer. International Journal of Cosmetic Science, 30(1), 23–29.

J

Jain D.P., Pancholi S.S ., Rakesh Patel R. (2011). Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2, 177–183.

K

Kalam, S., Singh, R.., Mani, A., Patel, J., Naem, KF., &Pandey, A. (2012). Antioxidants : elixir of life. International Multidisciplinary Research Journal, 1: 18-34.

Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. Biotechnology Advances, 33(6), 1063-1090.

Karas F., 2009. Gastéropodes terrestres, invertébrés continentaux des pays de la Loiregretia, 397 P.

L

Larba, R. (2014). Étude écophysiologique de la reproduction de l'escargot terrestre Petit-Gris (Helix aspersa aspersa) dans la région Nord-Est d'Annaba-Algérie (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar, Annaba).

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 Bioligy. 178 : 421-44

Lawal, A. O., Bamisaye, F. A., Alagbonsi, I. A., Olayiwola, G., & Adebayo, J. O. (2015). Evaluation of antioxidant activity of Giant African snail (Archachatina marginata) haemolymph in CCl_4-induced hepatotoxicity in albino rats. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 7(3), 38–45.

M

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

Mahmoudi, M., Bouterfas, K., & Bendimerad, N. (2023). Antioxidant activity, biochemical composition, and physicochemical properties of Helix aspersa snail slime. Biologia (Bratislava), 78, 179–188.

Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie, 51(6), 304-315.

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.

Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research, 15(2), 127–130.

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.

Milchunas, D. G., & Lauenroth, W. K. (1993). Quantitative effects of grazing on vegetation and soils over a global range of environments. Ecological Monographs, 63(4), 327–366.

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. [PDF disponible en ligne ou via des bibliothèques académiques]

Müller, O. F. (1774). Vermivm terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Havniae: Heineck & Faber.

N

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 dissertations, Université Rennes 1).

O

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44(6), 307–315.

P

Piana, E., & Zannella, C. (2024). Welfare of invertebrates: a pilot study on a new land snail stunning technique. Animals, 14(4), 617–628.

Pang, X., Cao, Y., Pan, H., & Liu, Y. (2010). Bioactive components from mollusks and their health effects: A review. Journal of Food Biochemistry, 34(6), 819–830.

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., Murray, P. G., & Mackenzie, C. D. (2015). Antimicrobial properties of mucus from the garden snail Helix aspersa. British Journal of Biomedical Science, 72(4), 174–181.

R

Raynova, Y., Ivanova, D., Tzvetanova, E., Nikolova, E., & Mileva, M. (2015). Antioxidant activity of Helix aspersa maxima (Gastropod) hemocyanin. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 68(12), 1501–1506. [Disponible sur ResearchGate ou bibliothèques universitaires]

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2(4), 152–159.

Rioux, J. D., et al. (2021). Combattre les infections intestinales contribue à prévenir la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Genome Medicine.

Rodrigues, É. A., Andrade, L. M., & Santos, D. S. (2005). Evaluation of antimicrobial activity by the McFarland method. Journal of Microbiology Methods, 61(2), 171–178.

S

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics whith phosphomolibdic phosphotungstic acids reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144–158.

Srairi-Abid, N. (2018). Helix aspersa maxima mucus exhibits antimelanogenic and antitumoral effects against melanoma cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 101, 871-880.

T

Trapella, C., Rizzo, R., Gallo, S., Alogna, A., Bortolotti, D., Casciano, F., Zauli, G., Secchiero, P., & Voltan, R. (2018). HelixComplex snail mucus exhibits pro-survival, proliferative and pro-migration effects on mammalian fibroblasts. Scientific Reports, 8, 17665.

U

Ulagesan, S., & Kim, H. J. (2018). Antibacterial and antifungal activities of proteins extracted from seven different snails. Applied Sciences, 8(8), 1362

V

Valgas, C., Souza, S. M., Smânia, E. F. A., & Smânia, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology, 38(2), 369–380.

W

Waluga-Kozlowska, E. W. A., Jasik, K., Wcislo-Dziadecka, D. O. M. I. N. I. K. A., Pol, P., Kuznik-Trocha, K. O. R. N. E. L. I. A., Komosinska-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).

Wang, Y., Zhang, L., & Zhang, C. (2017). Bioactive proteins and peptides from marine gastropods: Potential benefits in health and disease. Marine Drugs, 15(8), 253.

Z

Zaafour M., 2014. Étude écophysiologique de la reproduction de l'escargot terrestre Petit- Gris (Helix aspersa, Gastropoda : Stylommatophora ; Helicidea) dans la région Nord- Est
d'Annaba – Algérie.

Zielińska, M., et al. (2024). Carotenoids-fortified Helix aspersa slime and its biological activity. Journal of Cosmetic Dermatology.

Zou, Y., et al. (2023). Nutritional Composition, Fatty Acids Profile, Mineral Content, Antioxidant Activity and Acute Toxicity of the Flesh of Helix aspersa Müller. Molecules, 28(17), 6323.

(Www.inpn.mnhn.fr)

Annexes

Courbes d'étalonnages

Dosage des polyphénols

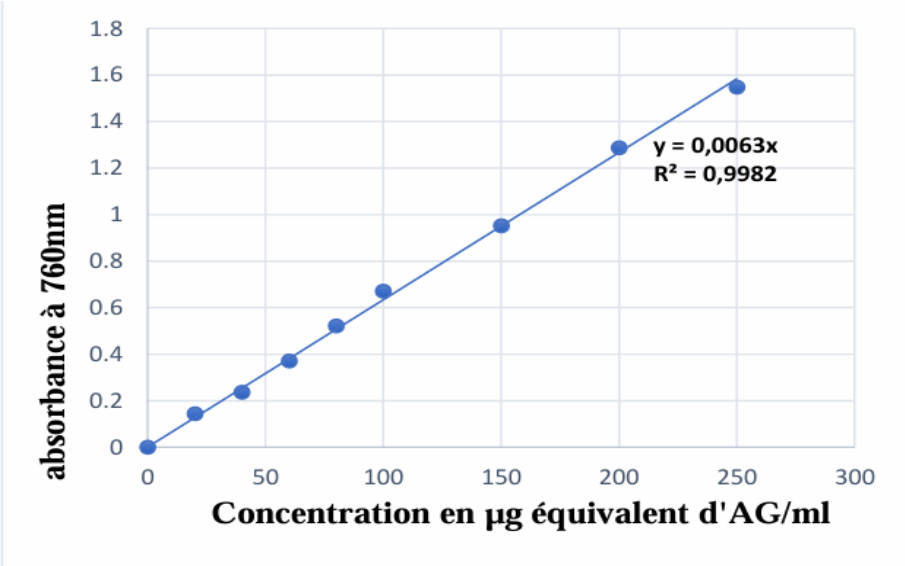


Figure 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Dosage des flavonoïdes

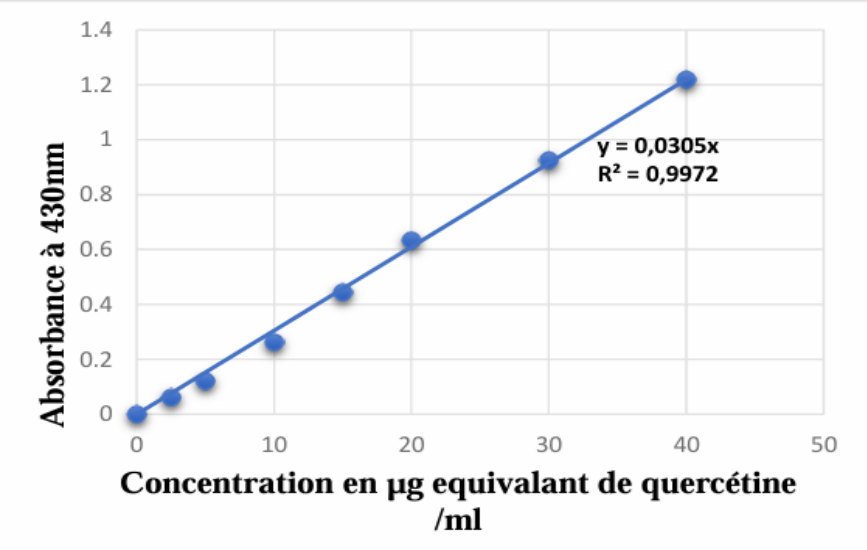


Figure 02 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Pouvoir réducteur du fer ferrique

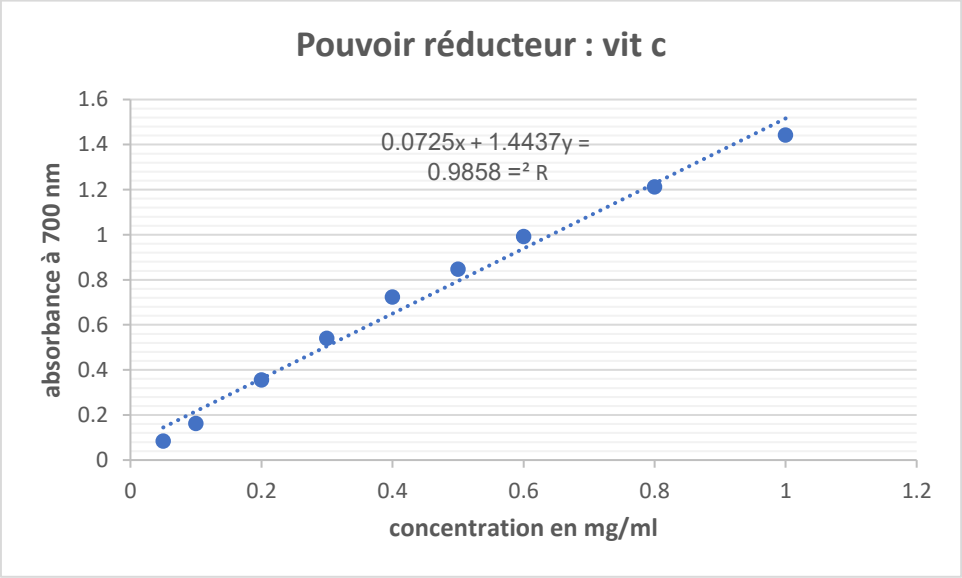


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

الملخص

يُعدّ الحلزون *Helix aspersa*المنتشر على نطاق واسع في الجزائر، مصدراً طبيعياً للمركّبات النشطة بيولوجيا ذات الخصائص العلاجية والتجميلية، لاسيما المخاط والهيموليمف. تهدف هذه الدراسة الى تقييم النشاطات المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا لهذين السائلين البيولوجيين، مع مقارنة طريقتين لاستخلاص المخاط: التنبيه الميكانيكي اللطيف والصدمة الحرارية بالماء البارد.

تم تقيم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقتين وهما اختبار تثبيط جذرالDPPHواختبار القدرة الاختزالية للحديد (FRAP)، اما النشاط المضاد للبكتيريا، فقد تم تحديده بواسطة طريقة الانتشار على وسط الآغار، على خمس سلالات بكتيرية.

أظهرت النتائج أن التنبيه الميكانيكي اللطيف يؤمّن مردودًا أعلى من المخاط، يتميّز بزيادة في الحجم وتركيبة بيوكيميائية غنية، تتضمّن نشاطًا مضادًا للأكسدة بدرجة معتدلة. في المقابل، تميّز الهيموليمف بتركيزات مرتفعة من البوليفينولات والفلافونويدات، إضافة إلى قدرة مضادّة للأكسدة قوية أُثبتت من خلال الاختبارين المستخدمين.

ومع ذلك، لم يُظهر أيّ من المستخلصات المختبرة تأثيرًا مضادًا للبكتيريا يمكن الكشف عنه، ويُحتمل أن يكون ذلك عدم التنقية أو انخفاض تركيز المركّبات الفعالة. ختامًا، تمثّل مخاط *Helix aspersa*بسبب مصدرا واعدا للمركّبات وهيموليمف الطبيعية المضادة للأكسدة، مما يبرّر إجراء دراسات إضافية لاستغلالها في مجالات التكنولوجيا الحيوية أو الصيدلة أو مستحضرات التجميل.

الكلمات المفتاحية: *Helix aspersa* – المخاط – الهيموليمف– النشاط المضاد للأكسدة – النشاط المضاد للبكتيريا

Résumé

L'escargot *Helix aspersa*, largement distribué en Algérie, est une source naturelle de substances bioactives aux propriétés thérapeutiques et cosmétiques, notamment la bave et l'hémolymphe. Cette étude vise à évaluer les activités antioxydantes et antibactériennes de ces fluides biologiques, en comparant deux méthodes d'extraction de la bave : la stimulation mécanique douce et le choc thermique l'eau froide.

L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de deux méthodes à savoir le piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur de fer (FRAP). L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose, appliquée à cinq souches bactériennes.

Les résultats montrent que la stimulation mécanique douce assure un rendement supérieur en bave, caractérisé à la fois par un volume accru et par une composition biochimique enrichie, incluant une activité antioxydante modérée. L'hémolymphe, quant à elle, se distingue par des concentrations élevées en polyphénols et flavonoïdes, ainsi qu'une forte capacité antioxydante mise en évidence par les deux tests utilisés.

En revanche, aucun des extraits testés n'a démontré d'effet antibactérien détectable, probablement en raison de l'absence de purification ou de la faible concentration en composés actifs. En conclusion, la bave et hémolymphe d'*Helix aspersa* représentent un potentiel prometteur en tant que sources naturelles d'agents antioxydants, justifiant des recherches complémentaires en vue de leur valorisation dans les domaines de la biotechnologie, de la pharmacie ou de la cosmétologie.

Mots-clés : *Helix aspersa* – Bave – Hémolymphe – Activité antioxydante – Activité antibactérienne

Abstract

The snail *Helix aspersa*, widely distributed in Algeria, is a natural source of bioactive substances with therapeutic and cosmetic properties, particularly its mucus and hemolymph. This study aims to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of these biological fluids, by comparing two mucus extraction methods: gentle mechanical stimulation and cold water thermal shock.

Antioxidant activity was assessed using two methods, namely DPPH radical scavenging and the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Antibacterial activity was determined using the agar diffusion method, applied to five bacterial strains.

The results show that gentle mechanical stimulation yields a higher amount of mucus, characterized by both a greater volume and an enriched biochemical composition, including moderate antioxidant activity. Hemolymph, on the other hand, is distinguished by high concentrations of polyphenols and flavonoids, as well as a strong antioxidant capacity demonstrated by both assays used.

However, none of the tested extracts exhibited detectable antibacterial effects, probably due to the lack of purification or low concentrations of active compounds. In conclusion, the mucus and hemolymph of *Helix aspersa* represent a promising potential as natural sources of antioxidant agents, justifying further research for their valorization in biotechnology, pharmaceutical, or cosmetic applications.

Keywords: *Helix aspersa* – Mucus – Hemolymph – Antioxidant activity – Antibacterial activity