



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI  
CONSTANTINE  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 65/D<sub>3</sub>C/2017  
N° de série : 12/BioA/2017

**Thèse**  
Présentée pour l'obtention  
**Du Diplôme de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle**  
En Biotechnologie, Biologie et Environnement  
Option : Immuno-Oncologie

Par

KOUACHI Meriem

*Thème :*

**Caractérisation et étude des propriétés immunomodulatrices,  
anti-inflammatoires et anti-tumorales des molécules  
bioactives extraites d'*Helix aspersa* : application dans la  
prévention du cancer colorectal expérimental chimio induit.**

**Membres du jury :**

Présidente :	Mme. SATTI Dalila.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directrice de thèse :	Mme. NAIMI Dalila.	Professeur	ENSB Taoufik Khaznadar-Constantine
Examinatrice :	Mme HAMBABA Leila.	Professeur	U. Hadj Lakhdar- Batna
Examinatrice :	Mme BERCHI Selima	Professeur	ENSB Taoufik Khaznadar-Constantine
Examinatrice :	Mme.TEBIBEL Soraya	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine

## **REMERCIEMENTS**

Je souhaite remercier tout particulièrement Madame le Pr. **NAIMI D.** qui m'a formé au long de mon parcours universitaire, pour m'avoir prodigué avec des qualités humaines et scientifiques exceptionnelles, des encouragements, des critiques constructives et surtout des conseils avisés. Je tiens à la remercier aussi pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant de diriger ce travail. J'ai tout particulièrement apprécié son entière disponibilité et la confiance qu'elle a manifestée en me laissant une liberté d'initiative sur différents aspects au sein de son équipe « *Biologie, Physiologie Cellulaire et Moléculaire* » du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression profonde de ma gratitude.

Une bonne partie de ce travail de thèse a été réalisée au sein de l'Ecole Nationale de Biotechnologie Taoufik Khaznadar, Constantine. Je tiens à remercier Monsieur le Pr **BOUSSABOUA H**, directeur de l'école, de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son établissement ainsi que tout le personnel et tout particulièrement Melle **HAFDI Ouissem** pour toute l'aide qu'elle m'a apporté.

Mes remerciements vont également à Mesdames : **TEBIBEL S**, Pr. **BERCHI S** et Pr. **HAMBABA L**, d'avoir bien voulu examiner ce travail, ainsi que Madame le Pr. **SATTA D**, d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie vivement Mr **YEKHLEF Y** pour sa précieuse collaboration lors de la réalisation des coupes histologiques au sein du laboratoire d'Anatomie-Pathologie du CHU Ibn Badis. Constantine.

Un grand merci à mes parents pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de mes longues années d'études.

Sans oublier l'ensemble des personnes que j'ai croisé au Biopole, mes collègues et amis, ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*A ma douce maman*

*A mon cher papa*

*A ma sœur son mari et ses enfants*

*A mon frère*

*A toute ma famille et mes amis(es)*

## RESUME

Un système immunitaire compétent est capable de détecter et d'éliminer non seulement les virus et les bactéries, mais aussi les cellules cancéreuses. Cependant, ces cellules peuvent développer une stratégie d'échappement permettant la formation de tumeurs malignes suite à une immunosuppression. Il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles molécules anti tumorales avec un potentiel immunostimulant. La recherche dans ce domaine s'intéresse principalement à l'extraction et la purification de ces molécules à partir de plantes médicinales. Cependant, l'objectif de notre travail est de chercher et de mettre en évidence l'effet immunomodulateur des extraits d'origine animale : l'escargot *Helix aspersa*, une espèce très répandue et largement consommée dans les pays méditerranéens. Notre travail débute par une caractérisation des extraits (bave, homogénat et extrait aqueux) et une évaluation de la dose toxique dans le but de choisir les doses adéquates à utiliser lors de nos expérimentations. Les extraits n'ont présenté aucune toxicité envers les animaux d'expérimentation ; les doses de 20 ml/Kg de bave, 5 mg/Kg d'homogénat et 300 µl/souris d'extrait aqueux ont été choisies. L'effet immunomodulateur s'est avéré immunostimulant lors de la réalisation d'un test de clairance du carbone, ce qui nous a amené à étudier d'autres effets thérapeutiques. Nos extraits exercent aussi un effet anti-inflammatoire envers la colite expérimentale chimio-induite. Les colites chroniques non traitées sont susceptibles de se développer en tumeur colorectale. L'effet anti-inflammatoire des extraits nous a incité à vérifier l'effet anti-prolifératif des cellules tumorales. La recherche de l'effet antitumoral a été réalisée *in vitro*, sur une culture de cellules tumorales mammaires MCF7 et *in vivo*, sur un cancer colorectal expérimental chimio induit. L'expérimentation *in vitro* a montré une inhibition de la prolifération des cellules tumorales à 56.39%. *In vivo*, l'observation des coupes histologiques des colons a confirmé que les extraits ont réparé l'architecture de la muqueuse colique après l'installation de la tumeur chimio induite. L'escargot *Helix aspersa* possède plusieurs effets thérapeutiques. Il serait donc intéressant de l'introduire dans l'alimentation quotidienne en guise de prévention ou en complément alimentaire dans un but curatif.

**Mots clés :** *Helix aspersa*, bave, homogénat, extrait aqueux, immunostimulation, inflammation, prolifération tumorale.

## ABSTRACT

A competent immune system is capable of detecting and eliminating not only viruses and bacteria, but also cancer cells. However, these cells can develop an escape strategy allowing the formation of malignant tumor following immunosuppression. It is therefore necessary to look for new anti-tumor drugs with an immunostimulatory potential. Research in this field focuses on the extraction and purification of these molecules from medicinal plants. However, the aim of our work is to seek and demonstrate the immunomodulatory effect of animal extracts: the *Helix aspersa* snail, a species widely used and widely consumed in the Mediterranean countries. Our work begins with a characterization of the extracts (slime, homogenate and aqueous extract) and an evaluation of the toxic dose in order to choose the appropriate doses to use during our experiments. The extracts showed no toxicity to experimental animals; Therefore, the doses of 20 ml / Kg of slime, 5 mg / Kg of homogenate and 300  $\mu$ l / mouse of aqueous extract were chosen. The immunomodulatory effect was shown to be immunostimulatory when performing a carbon clearance test, which led us to investigate other therapeutic effects. Our extracts also exert an anti-inflammatory effect against chemo-induced experimental colitis. Untreated chronic colitis is likely to develop as a colorectal tumor. The anti-inflammatory effect of the extracts prompted us to check the anti-proliferative effect. The investigation of the antitumor effect was carried out *in vitro*, on a culture of MCF7 mammary tumor cells and *in vivo*, on an experimental chemo-induced colorectal cancer. *In vitro* experiments showed an inhibition of tumor cell proliferation at 56.39%. *In vivo*, observation of the histological sections of the colonists confirmed that the extracts repaired the architecture of the colonic mucosa after the installation of the chemo-induced tumor. The *Helix aspersa* snail has several therapeutic effects. It would therefore be interesting to introduce it into the daily diet as a preventive or supplementary food for a curative purpose.

**Key words:** *Helix aspersa*, slime, homogenate, aqueous extract, immunostimulation, inflammation, tumor proliferation.

## ملخص

إن نظام المناعة الفعال قادر على الكشف والقضاء على الفيروسات والبكتيريا، و أيضا الخلايا السرطانية. ومع ذلك، يمكن لهذه الخلايا أن تضع استراتيجية لتجنب التعرض للنظام المناعي و بالتالي تشكيل الورم الخبيث. لذلك فمن الضروري البحث عن عقاقير جديدة لمكافحة الورم و تحفيز المناعة. تركز الأبحاث في هذا المجال على استخراج وتنقية هذه المركبات من النباتات الطبية. لكن الهدف من عملنا هو البحث وتسلط الضوء على المحفزات المناعية الموجودة في المستخلصات الحيوانية: الحلزون "هيليكس اسبيرسا" وهو نوع من الحلزونات المستهلكة نطاق واسع في دول البحر الأبيض المتوسط. تتمثل هذه المستخلصات في: العاب، جناسة الحلزون و المستخلص المائي. عند تقييم الجرعة السامة لم تظهر المستخلصات أي سمية بالنسبة لحيوانات التجارب، وبالتالي، تم اختيار جرعة 20 مل / كغ من العاب، 5 ملغ/كغ من جناسة الحلزون و 300 مل/كغ من المستخلص المائي . عند تطبيق اختبار تصفية الكربون تبين ان تأثير المستخلصات الحزونية على المناعة هو تأثير تأثير تحفيزي ، والذي أدى بنا إلى النظر في الآثار العلاجية الأخرى. المستخلصات الحزونية أيضا تمارس تأثير مضاد للالتهابات لالتهاب القولون التجريبي المستحدث كيميائيا. التهاب القولون المزمن الغير معالج قد يتطور إلى ورم القولون. . التأثير المضاد للالتهابات للمستخلصات الحزونية دفعنا لاختبار التأثير المضاد للأورام. أظهرت التجارب المخبرية المجراة على الخلايا السرطانية الثديية أن المستخلص المائي يثبيط تكاثر 56.39% من الخلايا السرطانية . أظهرت الملاحظة المجهرية للمقاطع النسيجية لقولون الفئران التي تعرضت للإستحداث الكيميائي للسرطان أن جناسة ولعاب الحلزون تمكنا من إصلاح بنية الغشاء المخاطي للقولون بعد تموضع الورم. الحلزون "هيليكس اسبيرسا" له العديد من الآثار العلاجية . سيكون من المثير للاهتمام أن ندخله في النظام الغذائي اليومي للوقاية أو كمكمل غذائي لأغراض علاجية.

## الكلمات المفتاحية:

الحلزون هيليكس اسبيرس، لعاب، جناسة، مستخلص المائي، تحفيز مناعي، التهاب، ورم

# Table des Matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

## **INTRODUCTION** **1**

## **PARTI BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>I-</b>	<b>L'INFLAMMATION</b>	<b>4</b>
1-	L'inflammation aiguë	5
2-	L'inflammation chronique	5
3-	Déroulement général des différentes étapes de la réaction inflammatoire	6
	3.1- La réaction vasculo-exsudative	6
	3.2- La réaction cellulaire	6
	3.3- La détersion	7
	3.4- Réparation et cicatrisation	8
<b>II-</b>	<b>LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (MICI)</b>	<b>8</b>
1-	Manifestations cliniques et anatomopathologie	9
	1.1- La maladie de Crohn (MC)	9
	1.2- La recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH)	11
2-	Complications et diagnostic des MICI	14
	2.1- La maladie de Crohn (MC)	14
	2.2- La recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH)	14
3-	Traitement des MICI	15
	3.1- La maladie de Crohn (MC)	15
	3.2- La recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH)	16
<b>III-</b>	<b>LE CANCER COLORCTAL (CCR)</b>	<b>16</b>
1-	L'apparition d'un cancer colorectal	17

2- Diagnostic du cancer colorectal	18
3- Classification du cancer colorectal	19
4- Stades du cancer colorectal	20
5- Grades du cancer colorectal	21
6- Traitement du cancer colorectal	21
6.1- La chirurgie	22
6.2- La radiothérapie	22
6.3- La chimiothérapie	23
6.4- L'immunothérapie (thérapie ciblée)	24

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre I : MATERIEL BIOLOGIQUE ET EXTRAITS**

I- INTRODUCTION	25
II- MATERIELS ET METHODES	28
1- Préparation des extraits	28
1.1- Extraction de la bave	28
1.2- Préparation de l'homogénat	28
1.3- Préparation de l'extrait aqueux	28
2- CARACTERISATION DES EXTRAITS	29
2.1- Composition chimique de la bave	29
2.1.1- Allantoïne	29
2.1.2- Elastine	29
2.1.3- Collagène	29
2.1.4- Vitamines A, C et E	29
2.1.5- Autres composants	29
2.2- Composition chimique de l'homogénat et l'extrait aqueux	29
2.2.1- Dosage des lipides	30
2.2.2- Dosage des protéines totales	31
2.2.3- Dosage des sucres totaux	31
2.2.4- Dosage des acides uroniques	32
2.2.5- Dosage des sucres sulfatés	33
2.2.6- Dosage des polyphénols	34



<b>3-</b> Estimation de la toxicité des extraits	<b>35</b>
<b>III-</b> RESULTATS	<b>36</b>
1- Caractérisation des extraits	<b>36</b>
2- Estimation de la toxicité des extraits	<b>37</b>
2.1- Poids des lots traités par la bave	<b>38</b>
2.2- Températures des lots traités par la bave	<b>39</b>
2.4- Poids des lots traités par l'homogénat	<b>41</b>
2.5- Températures des lots traités par l'homogénat	<b>42</b>
<b>IV-</b> DISCUSSION	<b>44</b>
<b>V-</b> CONCLUSION	<b>46</b>
<b>Chapitre II : EFFET IMMUNOMODULATEUR</b>	
<b>I-</b> INTRODUCTION	<b>47</b>
<b>II-</b> MATERIELS ET METHODES	<b>49</b>
<b>III-</b> RESULTATS	<b>51</b>
<b>IV-</b> DISCUSSION	<b>56</b>
<b>V-</b> CONCLUSION	<b>59</b>
<b>Chapitre III : EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE</b>	
<b>I-</b> INTRODUCTION	<b>60</b>
<b>II-</b> MATERIELS ET METHODES	<b>60</b>
1- Effet anti-inflammatoire de l'homogénat	<b>61</b>
2- Effet anti-inflammatoire de la bave	<b>62</b>
<b>III-</b> RESULTATS	<b>64</b>
1- Résultats biochimiques	<b>64</b>
2- Résultats macroscopiques	<b>69</b>
3- Résultats microscopiques	<b>71</b>
<b>IV-</b> DISCUSSION	<b>73</b>
<b>V-</b> CONCLUSION	<b>77</b>

<b>Chapitre IV : EFFET ANT-TUMORAL</b>	
I- INTRODUCTION	<b>78</b>
II- MATERIELS ET METHODES	<b>79</b>
1- Evaluation <i>–in vitro–</i> de l’effet antitumoral de l’extrait aqueux sur des cellules tumorales mammaires (MCF-7)	<b>79</b>
2- Evaluation <i>–in vivo–</i> de l’effet antitumoral de la bave et l’homogénat d’ <i>Helix aspersa</i> sur des souris <i>Mus musculus</i>	<b>80</b>
III- RESULTATS	<b>81</b>
1- Evaluation <i>–in vitro–</i> de l’effet antitumoral de l’extrait aqueux sur des cellules tumorales mammaires (MCF-7)	<b>81</b>
2- Evaluation <i>–in vivo–</i> de l’effet antitumoral de l’extrait aqueux sur des souris <i>Mus musculus</i>	<b>82</b>
2.1- Dosage de la protéine C réactive CRP	<b>82</b>
2.2- Observations macroscopiques	<b>83</b>
2.3- Observations microscopiques	<b>84</b>
IV- DISCUSSION	<b>91</b>
V- CONCLUSION	<b>99</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>100</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>103</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AA :</b>	Acide Acétique
<b>AFC :</b>	Aberrant Foci Cryptes
<b>ALAT :</b>	Alanine Aminotransférase
<b>ALT :</b>	Alanine Aminotransférase
<b>AOM :</b>	Azoxyméthane
<b>Aprifel :</b>	Agence pour les fruits et légumes
<b>ASA :</b>	Acide 5-Aminosalicilylique
<b>ASAT :</b>	Aspartate Aminotransférase
<b>AST :</b>	Aspartat Aminotransférase
<b>BcL2 :</b>	B-Cell Lymphoma 2
<b>BSA :</b>	Bovin Serum Albumine
<b>CD :</b>	Cluster Differentiation
<b>CRP :</b>	Protéine C Réactive
<b>DMEM :</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>DMSO :</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DO :</b>	Densité Optique
<b>DSS :</b>	Dextran Sodium Sulfate
<b>EMT :</b>	Epithelial to Mesenchymal Transition
<b>FC :</b>	Foyers de Cryptes
<b>GALT :</b>	Gut Associated Lymphoide Tissu

**GGT :** Gamma Glutamyltransférase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Peroxyde d'hydrogène

**HMG :** Homogénat

**HOCL :** Acide Hypochlorique

**Hs578T :** Lignée Cellulaire Tumorales Mammaire

**IC50 :** 50 % de la croissance cellulaire

**IL-1-β :** Interleukine 1-β

**IL-6 :** Interleukine 6

**K :** Indice Phagocytaire

**MCF-7 :** Michigan Cancer Foundation-7 (Lignée Cellulaires Tumorales Mammaires)

**MDA :** Taux De Malondialdéhyde

**MGG :** MayGranwald Giemsa

**MICI :** Maladie Inflammatoire Chroniques De l'Intestin

**MPO :** Myéloperoxydase

**MTT :** Sel De Tétrazolium (Bromure De 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-Yl)-2,5diphényl Tétrazolium)

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> :** Carbonate De Sodium

**NaCl :** Chlorure De Sodium

**NADPH :** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**NF-κB :** Nuclear Factor-Kappa Light Chain Enhancer Of Activated B Cell

**PEG :** Polyéthylène Glycol

**PMN :** Leucocytes Polymorphonucléaires

**PNN :** Polynucléaire Neutrophiles

**PTEN :** Phosphatase And Tensin Homology Deleted On Chromosom Ten

**TBAR :** Acide Thiobarbiturique

**TGO :** Glutamate-Oxaloacetate-Transaminase

**TGP :** Glutamate-Pyruvate-Transaminase

**TNF- $\alpha$  :** Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TNM:** Tumor Nodes Metastasis

**UI:** Unité Internationale

**UK :** Kit Randox

**$\alpha$  :** Indice Phagocytaire Corrigé

**$\gamma$ GT :** Gamma- Glutamyl –Transpeptidase

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Représentation des pathologies reprises sous le terme de MICI.
- Figure 2:** Modèle de la pathogénie des MICI.
- Figure 3:** Localisation des lésions dans la maladie de Crohn.
- Figure 4:** Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCUH
- Figure 5:** Aspect anatomopathologique de la maladie de Crohn et de la RCUH.
- Figure 6:** Stades du cancer colorectal
- Figure 7:** *Helix aspersa* (Petits gris)
- Figure 8:** Gamme d'étalonnage de l'huile de tournesol
- Figure 9:** Gamme d'étalonnage de l'albumine de sérum bovin
- Figure 10:** Gamme d'étalonnage du glucose.
- Figure 11:** Gamme d'étalonnage de l'acide glucuronique
- Figure 12:** Gamme d'étalonnage du sulfate de dextran
- Figure 13:** Gamme d'étalonnage de l'acide gallique
- Figure 14:** Proportions des différents composés dans l'extrait d'escargot *Helix aspersa*
- Figure 15:** Poids des animaux traités par 600 µl de bave (dose égale à 20 ml/Kg)
- Figure 16:** Poids des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6 ml/Kg)
- Figure 17:** Poids des animaux traités par 1000 µl de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg)
- Figure 18:** Températures des animaux traités par 600 µl de bave (dose égale à 20 ml/Kg)
- Figure 19:** Températures des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6 ml/Kg)
- Figure 20:** Températures des animaux traités par 1000 µl de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg)
- Figure 22:** Poids des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg)
- Figure 23:** Poids des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg)
- Figure 24:** Poids des animaux traités par 160 mg d'homogénat (dose égale à 5 g/Kg)
- Figure 25:** Températures des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg)

- Figure 26:** Températures des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg)
- Figure 27:** Températures des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg)
- Figure 28:** Activité phagocytaire (K) des souris traitées par l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*
- Figure 29:** Demi-vie du carbone injecté aux souris traitées par l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*
- Figure 30:** Indice phagocytaire corrigé ( $\alpha$ ) des souris traitées par l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*
- Figure 31:** Frottis sanguins du lot Contrôle (300  $\mu$ l NaCl 9‰) à  $T_1 = 5$  min et  $T_2 = 15$  min.
- Figure 32:** Frottis sanguins du lot traité par 50 mg/Kg d'extrait à  $T_1 = 5$  min et  $T_2 = 15$  min.
- Figure 33:** Frottis sanguins du lot traité par 100 mg/Kg d'extrait à  $T_1 = 5$  min et  $T_2 = 15$  min.
- Figure 34:** Frottis sanguins du lot traité par 250 mg/Kg d'extrait à  $T_1 = 5$  min et  $T_2 = 15$  min.
- Figure 35:** Taux de la Glutamate-Oxaloacetate-Transaminase (TGO)
- Figure 36:** Taux de la Glutamate-Pyruvate-Transaminase (TGP)
- Figure 37:** Taux de la Gamma Glutamyl Transpeptidase ( $\gamma$ gt)
- Figure 38:** Taux de la Protéine C Réactive (CRP)
- Figure 39:** Taux du Malondialdéhyde (MDA)
- Figure 40:** Taux des Protéines Totales Plasmatiques
- Figure 41:** Taux des Protéines Totales Hépatiques
- Figure 42:** Observation macroscopique des colons
- Figure 43:** Observation microscopique des coupes histologiques des colons
- Figure 44:** Effet antiprolifératif de l'extrait aqueux sur des cellules tumorales mammaires MCF-7
- Figure 45:** Taux de la protéine C réactive (CRP)
- Figure 46:** Aspect macroscopiques des colons
- Figure 47:** Observation microscopique des coupes histologiques des colons

**Figure 48:** Observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot AOM

**Figure 49:** Observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot PEG

**Figure 50:** Observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot HMG

**Figure 51:** Observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot Bave

**Figure 52:** Activation du récepteur de l'egf et des voies de signalisation intracellulaire

**Figure 53:** Développement de la carcinogénèse et développement de la tumeur colorectale associée à l'inflammation et induite par l'aom/DSS.

**Figure 54:** Mécanisme moléculaire par lequel le PEG supprime l'hyperprolifération de la muqueuse colique.



## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1:** Classification TNM
- Tableau 2:** Traitement des souris par différentes doses de bave et d'homogénat
- Tableau 3:** Concentrations des substances dosées dans l'extrait aqueux d'*Helix aspersa* (mg/ml)
- Tableau 4:** Teneur en polyphénols dans certains légumes
- Tableau 5:** Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'homogénat de l'escargot  
*Helix aspersa*
- Tableau 6:** Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de la bave de l'escargot  
*Helix aspersa*
- Tableau 7:** Induction de la tumeur colique et traitement des souris par les extraits de l'escargot *Helix aspersa*
- Tableau 8 :** Pourcentage des cellules viables après traitement par différentes dilution de l'extrait aqueux
- Tableau 9:** Poids (g) des animaux traités par 600 µl de bave (dose égale à 20 ml/Kg) (Annexe 2)
- Tableau 10:** Poids (g) des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6 ml/Kg) (Annexe 2)
- Tableau 11:** Poids (g) des animaux traités par 1000 µl de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg) (Annexe 2)
- Tableau 12:** Températures (°C) des animaux traités par 600 µl de bave (dose égale à 20 ml/Kg) (Annexe 2)
- Tableau 13:** Températures (°C) des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6ml/Kg) (Annexe 2)
- Tableau 14:** Températures (°C) des animaux traités par 1000 µl de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg) (Annexe 2)
- Tableau 15:** Poids (g) des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg) (Annexe 3)
- Tableau 16:** Poids (g) des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg) (Annexe 3)

- Tableau 17:** Poids (g) des animaux traités par 160 mg d'homogénat (dose égale à 5 g/Kg) (Annexe 3)
- Tableau 18:** Températures (°C) des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg) (Annexe 3)
- Tableau 19:** Températures (°C) des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg) (Annexe 3)
- Tableau 20:** Températures (°C) des animaux traités par 160 mg d'homogénat (dose égale à 5 g/Kg) (Annexe 3)
- Tableau 21:** Activité phagocytaire du lot contrôle (300 µl nacl 9‰) (Annexe 4)
- Tableau 22:** Activité phagocytaire du lot traité par 50 mg/Kg d'extrait aqueux (Annexe 4)
- Tableau 23:** Activité phagocytaire du lot traité par 100 mg/Kg d'extrait aqueux (Annexe 4)
- Tableau 24:** Activité phagocytaire du lot traité par 250 mg/Kg d'extrait aqueux (Annexe 4)
- Tableau 25:** Paramètres biochimiques des groupes traités par l'homogénat (Annexe 5)
- Tableau 26:** Paramètres biochimiques des groupes traités par la bave. (Annexe 5)
- Tableau 27:** Taux de la protéine C réactive (CRP) (Annexe 6)
- Tableau 28:** Pourcentage des cellules viables après traitement par différentes dilutions de l'extrait aqueux (test MTT) (Annexe 6)

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Le cancer est une maladie qui résulte d'un ensemble de transformations malignes des cellules de l'organisme, durant lesquelles elles présentent certaines modifications biologiques telles que : l'activation continue des voies de signalisation responsables de la prolifération cellulaire, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, la résistance à la mort cellulaire et la stimulation de l'angiogenèse (Hanahan et Weinberg, 2000). Récemment, les chercheurs ont aussi rajouté deux autres caractéristiques, la reprogrammation de l'énergie et du métabolisme cellulaire ainsi que l'échappement au système immunitaire. Les transformations malignes sont aussi favorisées par l'instabilité du génome et l'inflammation (Hanahan et Weinberg, 2011).

Cependant, la plupart des agents anti-cancéreux ont pour but principal d'induire une mort cellulaire programmée dans les cellules tumorale. La mort cellulaire programmée (apoptose) est une réponse cellulaire durant le développement qui permet d'éliminer des cellules indésirables (Kromer et al, 2009). L'apoptose est le type de mort cellulaire programmée le plus étudié. La cascade apoptotique est déclenchée par un stress mitochondrial ou par une activation des récepteurs de mort cellulaire comme le TNF $\alpha$ . Ce dernier est capable de déclencher d'autres formes de mort cellulaire programmée appelées « non apoptotique » comme la nécrose programmée ou la nécroptose (Christofferson et Yuan, 2010 ; Portt et al, 2011).

Ces dernières années, l'intérêt porté aux molécules bioactives naturelles et leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés, à partir de plusieurs organismes naturels. A savoir, les plantes médicinales, les animaux et récemment, de nouvelles sources ont été exploitées comme les lichens, les microorganismes et les organismes marins (Rajasekarna et al, 2008 ; Holdt et Kraan, 2001).

Les animaux sont utilisés dans la médecine traditionnelle depuis l'antiquité. Jusqu'à présent, certaines populations, en Brésil, en Turquie, Moyen Orient, Inde, chine et Corée utilisent encore les insectes, les gastéropodes, les reptiles, les amphibiens et même les oiseaux et les mammifères pour traiter différentes maladies. Cependant, de nombreuses espèces sont impliquées dans la zoothérapie telle que *Thebapiasana*, *Helix pomatia* et *Helix aspersa* (Benitez, 2011 ; Barros, 2012).

L'escargot, est un mollusque gastéropode pulmoné du genre Hélix. Il l'est utilisé en médecine, domaine dans lequel on n'a cessé, depuis l'antiquité, de lui attribuer de multiples propriétés. C'est alors principalement *l'Hélix pomatia* (escargot de Bourgogne) qui est utilisé, mais également *l'Helix aspersa* ou encore l'escargot de mer : *Helix maritima*.

En effet, avec le temps, la diversité d'emploi des escargots en thérapeutique a pris de l'ampleur : dès l'Antiquité, de multiples utilisations des escargots à des fins thérapeutiques ont vu le jour. Des personnages de l'antiquité font état de l'utilisation de l'escargot: « Hippocrate » recommande le mucus de limaçon contre la protocèle. « Celse » considère l'escargot cru et pilé avec sa coquille comme cicatrisant ; bouilli, il aurait des propriétés émollientes. (Bonnemain, 2003).

Durant le moyen-âge, L'abbesse bénédictine Hildegarde de Bingen, estime (dans son livre des subtilités des créatures divines, XIIe siècle), que la nature froide de l'escargot lui permet d'enrayer le feu de l'infection. Plus tard, en 1738, la Pharmacopée universelle de « Lemery » nous donne la façon de préparer l'eau de limaçons. Le XIXe siècle réhabilite totalement l'escargot pour lui accorder une place importante en thérapeutique et débute, en 1808, avec les travaux de « Georges Tarenne » sur l'emploi de cet animal contre la hernie, ayant constaté que le "suc d'escargot" se fixe de façon particulièrement tenace sur les textiles, «Tarenne » a pensé qu'il pénétrerait facilement la peau et se répandrait ainsi dans toute la partie malade (Cranga, 1993).

En 1840, « O. Figuiet » publie un mémoire sur la composition chimique des escargots et sur les préparations pharmaceutiques dont ils sont la base. Dans son mémoire sur les préparations à base d'hélicine admises à l'exposition universelle de 1855, «Baron-Barthélémy » parle de l'hélicine, Il cite également les nombreuses indications des préparations héliciées. Elles peuvent être employées contre la plupart des phlegmasies, contre les rhumes et les toux opiniâtres, les bronchites, les catarrhes, les asthmes, les diverses hémoptysies, les inflammations des amygdales, angines, enrouements et la grippe. Les travaux de ce siècle sont approuvés par des médecins utilisant ces préparations.

Ainsi le Docteur «Chrestien» de Montpellier explique à propos de la pâte et du sirop d'escargot de la Maison Mure : « Depuis 50 ans que j'exerce la médecine, je n'ai pas trouvé de remède plus efficace que les escargots contre les irritations de poitrine. Les travaux du XXe siècle vont réellement confirmer les propriétés thérapeutiques de l'escargot ». Mais ce siècle est avant tout marqué par les travaux de « Quevauviller », en 1953, qui expose

la composition chimique des Hélix : plus de trente enzymes dans le suc digestif, de nombreuses enzymes dans l'hépatopancreas, le muscle et l'hémolymphe (Bonnemain, 2003). Il met en évidence les activités pharmacologiques du mucus : une activité mucolytique *in-vitro*, une action inhibitrice sur les cultures de bacilles coquelucheux et une activité spasmolytique sur les voies respiratoires. Les travaux de « Quevauviller » et son équipe aboutissent en 1957 à la mise sur le marché de l'Hélicidine, sirop antitussif employé chez l'adulte et l'enfant comme chez le nourrisson. Plus tard, « Pons et al. » (1999) montrent que l'effet broncho relaxant de l'hélicidine fait intervenir une libération de prostaglandine E2. (Bonnemain, 2003).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est d'étudier quelques effets thérapeutiques de 3 extraits de l'escargot *Helix aspersa* (bave, homogénat du muscle et un extrait aqueux) sur le profil immunitaire, l'inflammation, la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier lieu, nous allons caractériser nos extraits par des dosages de quelques paramètres biochimiques et évaluer leur toxicité pour pouvoir choisir les bonnes doses à administrer aux animaux lors de nos expérimentations.

Après le choix des doses adéquates, nous allons entamer l'étude de l'effet immunomodulateur pour savoir si on est face à une immunostimulation ou une immunosuppression chez les animaux après administration de nos extraits.

Suite à la détection du profil immunitaire, nous nous intéresserons à l'étude de l'effet anti-inflammatoire sur une colite expérimentale chimio-induite. L'effet antitumoral sera mis en évidence *in vitro* sur une culture de cellules tumorales mammaires MCF7 et *in vivo* sur un cancer colorectal expérimental chimio-induit chez des souris *Mus musculus*.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## I- L'INFLAMMATION

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme à une agression ayant pour origine des éléments physiques : chaleur, froid, rayonnements ionisants... ou des éléments solides exogènes ou endogènes : pathogènes microbiens, piqûre d'insecte, produits chimiques ou biologiques, composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines...). Quelle que soit la nature du facteur déclenchant, les manifestations de la réponse inflammatoire seront les mêmes mais avec des intensités et des durées variables.

La réaction inflammatoire peut être aiguë, voire suraiguë ; se manifeste immédiatement après l'intrusion des micro-organismes et dure jusqu'à 48 h environ. Elle est la réponse typique du système immunitaire inné. Pour exemple, on observe des états infectieux sévères lors de pancréatites aiguës, de brûlures... La réaction inflammatoire peut aussi être chronique et ainsi durer des semaines, voire des années (Zerbato, 2010).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents pathogènes. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- infection : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons).
- agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, irradiations.
- agents chimiques : caustiques, toxines, venins.
- antigènes : exogènes ou endogènes.
- défaut de vascularisation : réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie.
- agression dysimmunitaire (anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité).



L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extra-cellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire. Quel que soit son siège et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, l'organe où elle se déroule, le terrain physiologique de l'hôte : tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel (Rousselet, 2005).

### **1- L'inflammation aigue**

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Gruys et al. 2005).

### **2- L'inflammation chronique**

C'est une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques :

- Les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (détersion incomplète) ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.
- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes, ou d'affections où les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (exemple : hépatite chronique active secondaire à une infection par virus de l'hépatite B ou C).

### **3- Déroulement général des différentes étapes de la réaction inflammatoire**

La réaction inflammatoire est un processus dynamique comportant plusieurs étapes successives : la réaction vasculo-exsudative, la réaction cellulaire, la détersion, la phase terminale de réparation et cicatrisation

#### **3.1- La réaction vasculo-exsudative**

Elle se traduit cliniquement par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë: rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur. Elle comporte trois phénomènes :

- Une congestion active : c'est une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte.
- Un œdème inflammatoire qui résulte du passage d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses.
- Une diapédèse leucocytaire qui correspond à la migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer inflammatoire. (Nathant, 2002)

#### **3.2- La réaction cellulaire**

La réaction cellulaire se caractérise par la formation du granulome inflammatoire ou tissu de granulation inflammatoire. Le foyer inflammatoire s'enrichit rapidement en cellules provenant du sang ou du tissu conjonctif local.

- Du sang : polynucléaires, monocytes et lymphocytes. Après diapédèse, ces leucocytes quittent le territoire péri-vasculaire et migrent vers le foyer lésionnel par chimiotactisme. Les agents chimiotactiques, produits par les tissus altérés, par des bactéries et par les leucocytes déjà présents dans le foyer inflammatoire, se fixent sur des récepteurs membranaires des leucocytes, ce qui conduit à l'activation de leur cytosquelette et à leur mobilisation.
- Du tissu conjonctif local : fibroblastes, cellules endothéliales, mastocytes et macrophages résidents. (Karhausen et al, 2013 ; Segura et Amigorena, 2013)

Localement, certaines cellules vont se multiplier (c'est le cas des fibroblastes, lymphocytes, cellules endothéliales, et à un moindre degré des macrophages) et/ou vont se transformer ou se différencier :

- Accumulation de polynucléaires dont la durée de vie est courte, leurs enzymes sont libérées dans le foyer inflammatoire. L'apport de nouveaux neutrophiles doit être soutenu dans les phases initiales de l'inflammation par une production hématopoïétique accrue.
- Les monocytes deviennent des macrophages activés capables de phagocytose, de sécrétion de nombreux médiateurs et de coopération avec les lymphocytes pour le développement de la réaction immunitaire (présentation de molécules antigéniques aux lymphocytes). Leur durée de vie est plus longue que celle des polynucléaires.
- Transformation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des immunoglobulines ; activation des lymphocytes T : sécrétion de nombreux médiateurs, acquisition de propriétés cytotoxiques et coopération avec les lymphocytes B.
- Modification des fibroblastes en myofibroblastes : acquisition de propriétés contractiles et synthèse des constituants de la matrice extra-cellulaire. (Kolaczowska et al, 2013)

### **3.3- La détersion**

Elle succède progressivement à la phase vasculo-exsudative, et est contemporaine de la phase cellulaire. La détersion peut être comparée à un nettoyage du foyer lésionnel : c'est l'élimination des tissus nécrosés (issus de l'agression initiale ou du processus inflammatoire lui-même), des agents pathogènes et de l'exsudat.

La détersion prépare obligatoirement la phase terminale de réparation-cicatrisation. Si la détersion est incomplète, l'inflammation aiguë va évoluer en inflammation chronique. La détersion s'effectue selon 2 mécanismes : détersion interne et externe. (Ahmed, 2011)

- **Détersion interne**

Il s'agit de l'élimination des tissus nécrosés et de certains agents pathogènes (micro-organismes infectieux, corps étrangers) par phagocytose, tandis que le liquide d'œdème est drainé dans la circulation lymphatique et résorbé par les macrophages par pinocytose.

- **Détersion externe**

Elle peut être spontanée et se produit par liquéfaction du matériel nécrosé et élimination par fistulisation à la peau ou dans un conduit naturel bronchique, urinaire, ou intestinal. La détersion externe peut aussi s'effectuer par parage chirurgicale qui est souvent indispensable lorsque les lésions sont trop étendues ou souillées. (El kebir et Filep, 2013)

### **3.4- Réparation et cicatrisation**

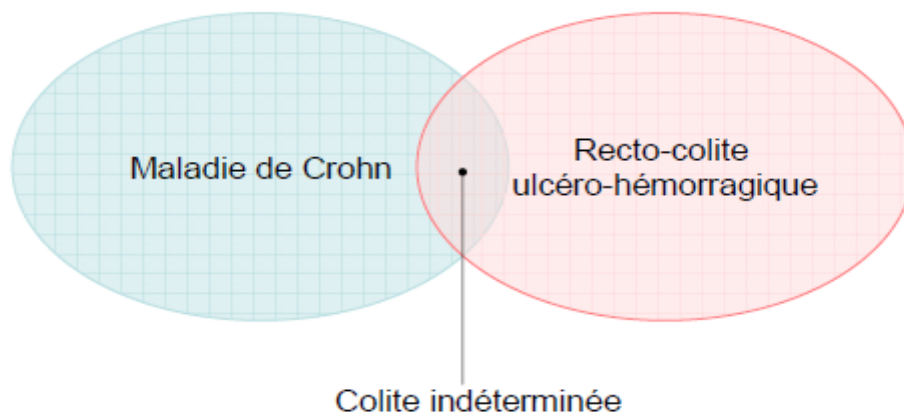
La réparation tissulaire suit une détersion complète. Elle aboutit à une cicatrice si le tissu lésé ne peut régénérer (ex : neurones ou cellules musculaires myocardiques) ou lorsque la destruction tissulaire a été très importante et/ou prolongée. (Velnar et al, 2009)

La réparation peut aboutir à une restitution intégrale du tissu : il ne persiste alors plus aucune trace de l'agression initiale et de l'inflammation qui a suivi. Cette évolution très favorable est observée lors d'agressions limitées, brèves et peu destructrices dans un tissu capable de régénération cellulaire.

Le processus de réparation implique de nombreux facteurs de croissance et des interactions complexes entre les cellules et la matrice extra-cellulaire pour réguler les proliférations et biosynthèses cellulaires. (Ortega-Gómez et al, 2013).

## **II- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)**

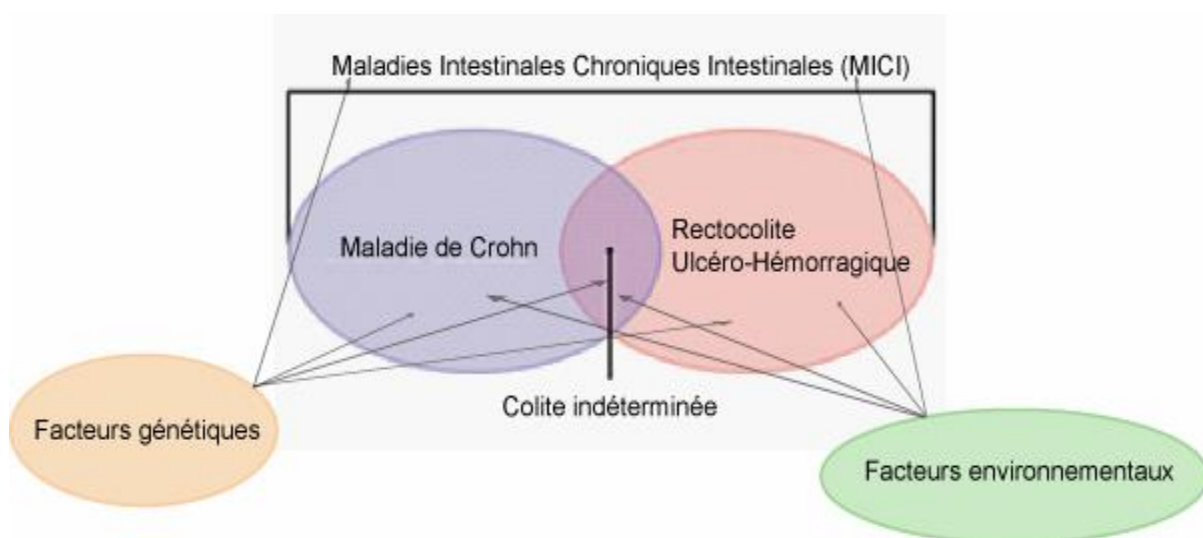
Ce terme regroupe deux pathologies inflammatoires intestinales chroniques, d'étiologie inconnue dont la présentation clinique et morphologique est différente : la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH). Elles affectent des sujets jeunes et évoluent par poussées suivies de rémissions. Une troisième entité peut être ajoutée, la « colite indéterminée », présentant les caractéristiques d'une colite idiopathique pour laquelle l'ensemble des examens réalisés ne permet pas de trancher entre maladie de Crohn et recto-colite (**Figure 1**).



**Figure 1 :** Représentation des pathologies reprises sous le terme de MICI.

Au cours des dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension des MICI, leur étiologie reste cependant peu claire. On pense aujourd'hui que, si les conditions génétiques sont remplies, il peut se produire une dérégulation immunologique dont l'origine reste méconnue. Celle-ci va entraîner une réponse immunologique anormale à des stimuli antigéniques qui sont normalement bien tolérés (flore bactérienne intestinale).

Des facteurs génétiques jouent un rôle important dans le développement d'une MICI. Une anamnèse familiale positive pourrait être le facteur de risque le plus important dans le déclenchement d'une MICI. (Bonenet Cho, 2003). (**Figure 2**).



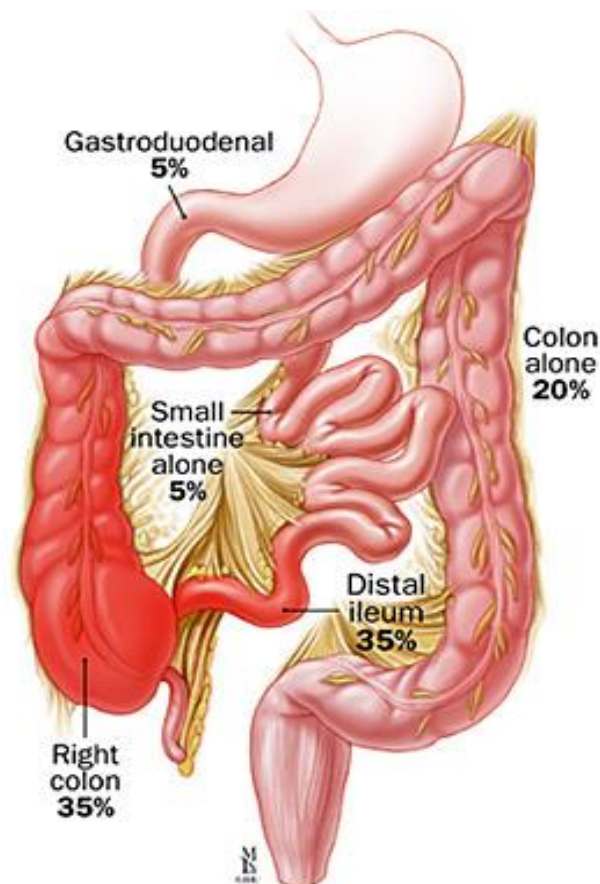
**Figure 2:** Modèle de la pathogénie des MICI.

## 1- Manifestations cliniques et anatomopathologie

### 1.1- La maladie de Crohn (MC)

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire de l'intestin qui peut atteindre n'importe quelle partie du tube digestif, de la cavité buccale jusqu'à l'anus. L'inflammation chronique de la paroi intestinale conduit à la perte de fonction physiologique de l'intestin. C'est une maladie chronique qui comporte des phases d'activité d'intensité variable alternant avec des phases de rémissions (Lapaquette et al, 2012).

Les lésions atteignent principalement la région iléo-colique mais peuvent toucher tout le tube digestif, de la bouche à l'anus (**Figure 3**). Deux entités peuvent être distinguées dans la maladie de Crohn : la forme iléale (ou iléocœcale) et la forme colique pure. L'atteinte iléale est la plus fréquente et est retrouvée chez deux tiers des patients. C'est la forme présentant le plus de complications (sténose, fistules, abcès). (Morel, 2014).



**Figure 3 :** Localisation des lésions dans la maladie de Crohn. (Rasenack et al, 2010)

Selon les caractéristiques initiales de la maladie, on distingue 3 phénotypes :

- Le phénotype inflammatoire, le plus répandu.
- Le phénotype sténosant.
- Le phénotype perforant. (Satsangi et al, 2006).

Toutefois la majorité des patients présentent une complication de type fistule ou sténose au cours de l'évolution de leur maladie quel que soit le phénotype de départ. A l'heure actuelle, la cause exacte de la MC n'est pas encore entièrement identifiée. Cette pathologie est multifactorielle et de nombreuses composantes semblent être étroitement intriquées pour provoquer ce phénotype complexe. La MC implique une susceptibilité génétique, une flore intestinale perturbée, un dysfonctionnement immunitaire et un rôle de l'environnement (Sartor, 2006 ; Zhang et al, 2014).

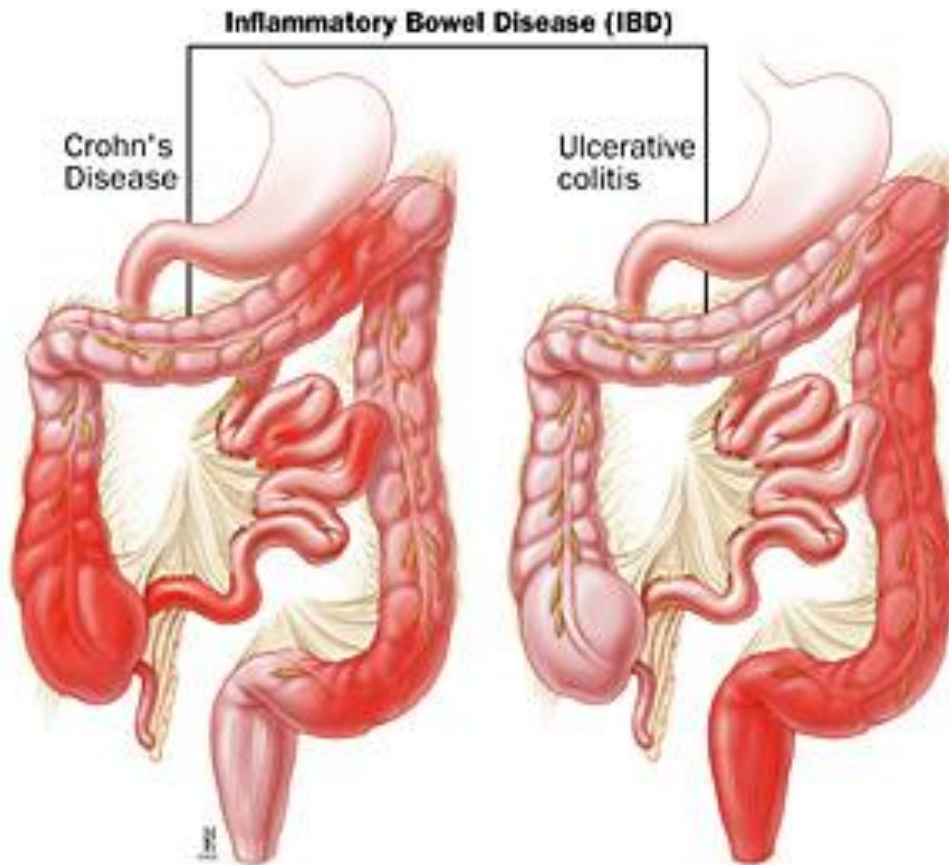
### **1.2- La recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH)**

La RCUH est caractérisée par une inflammation chronique évolutive touchant exclusivement le rectum et le colon. Elle se caractérise par des phases aiguës entrecoupées de périodes de rémission.

Les manifestations cliniques principales de la RCUH sont la douleur abdominale et la diarrhée muco-sanglante. L'atteinte rectale isolée entraîne un tableau clinique de rectorragie, ténésme et parfois constipation.

La majorité des patients atteints de RCUH présentent une maladie intermittente et d'une gravité allant de mineure à modérée. Chez les patients présentant une forme sévère, la totalité du colon est atteinte, menant à une diarrhée sanglante importante et à des symptômes systémiques tels que fièvre et amaigrissement. Comme pour la maladie de Crohn, des manifestations extra-intestinales sont associées à la RCUH.

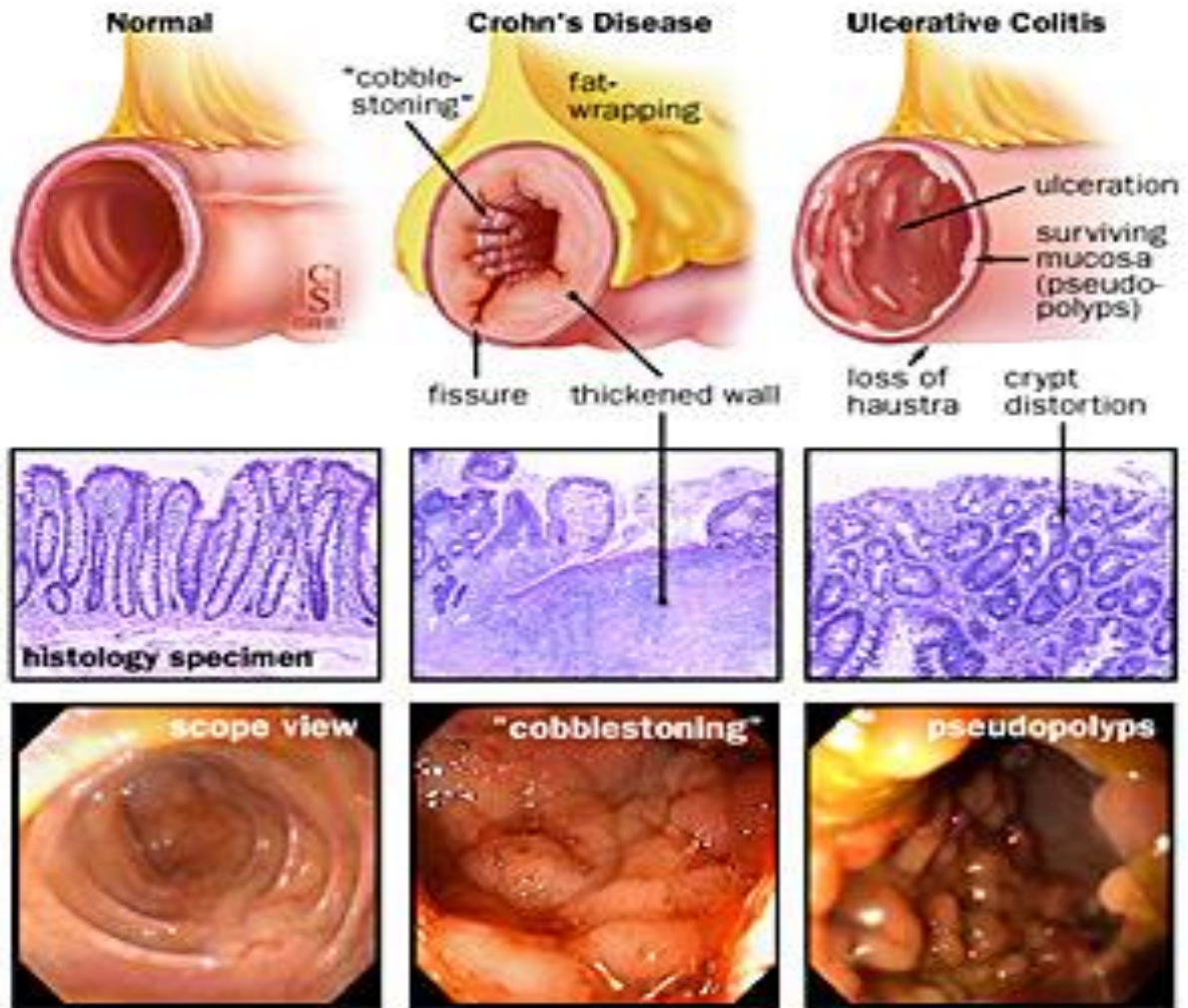
Contrairement à la maladie de Crohn les lésions de la RCUH s'étendent de manière continue, sans intervalle de muqueuse saine, à partir de la ligne pectinéale pour atteindre une portion plus ou moins importante du rectum et du colon (**Figure 4**). La RCUH ne dépasse pas la valvule de Bauhin, cependant une iléite distale peut être observée lors d'une atteinte complète du colon (iléite de reflux) (D'Haens *et al*, 1997). Le rectum est presque systématiquement atteint.



**Figure 4 :** Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCUH.  
(Rasenack et al, 2010)

Les lésions n'atteignent que les couches superficielles de la paroi, la muqueuse et la sous-muqueuse, expliquant la rareté des fistules et sténoses. Au début de la maladie, la muqueuse est turgescente et présente de nombreuses petites ulcérations sanglantes. Lors de la cicatrisation de ces ulcères, des îlots de muqueuse peuvent former des pseudopolypes. L'inflammation chronique entraîne une fibrose de la sous-muqueuse avec une disparition des haustrations et un raccourcissement du colon (**Figure 5**).





**Figure 5 :** Aspect anatomopathologique de la maladie de Crohn et de la RCUH.

L'aspect microscopique de la muqueuse permet d'évaluer le stade évolutif de la pathologie (abcès cryptiques et cryptes régulières hypoclines en phase chronique active, raréfaction et déformation des cryptes hypoclines en phase de résolution, augmentation de la déformation cyptique, diminution de la congestion vasculaire au stade quiescent).

## **2- Complications et diagnostic des MICI**

### **2.1- La maladie de Crohn (MC)**

Les complications intestinales de la MC sont souvent liées à leur localisation. Elles comprennent les sténoses et obstructions intestinales, les fistules et abcès, les hémorragies digestives et la cancérisation. Les cancers du côlon sont trois fois plus fréquents chez les patients atteints de MC par rapport à la population générale (Friedman, 2006); ceux du grêle sont même jusqu'à 30 fois plus fréquents.

Le diagnostic de la MC repose sur des caractéristiques morphologiques ainsi que sur l'exclusion d'une maladie du grêle ou colique spécifique.

On utilisera différentes techniques d'imagerie médicale (lavement baryté, endoscopie avec biopsies, tomodensitométrie). Des examens sériques et coprologiques sont réalisés en vue de rechercher une infection spécifique.

Un dosage des anticorps sériques peut être effectué afin d'orienter le diagnostic. En effet, les patients atteints de MC présentent plus fréquemment des anticorps périmucléaire anti-neutrophile (pANCA) et anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) par rapport à la population générale, alors que dans la RCUH ce sont uniquement les pANCA qui sont présents. Les statuts sérologiques ANCA+/ASCA- pour la RCUH et ANCA+/ASCA+ pour la MC peuvent apporter une aide à la classification des patients entre ces deux sous-groupes, cependant ces tests restent peu sensibles.

Une évaluation du stade clinique de la maladie peut être effectuée selon différents critères. Un des index utilisé est l'index d'activité CDAI (Crohn's Disease Activity Index), basé sur des données cliniques et biologiques qui sont : nombre de selles liquides, douleur abdominale, bien-être, présence de symptômes liés à la pathologie, traitement de la diarrhée, masse abdominale, taux d'hématocrite et perte de poids (Sostegriet *al*, 2003).

### **2.2- La recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH)**

La complication la plus redoutable de la RCUH est la survenue d'un mégacôlon toxique. Suite à l'extension de l'inflammation aux couches profondes de la paroi, celle-ci est fragilisée, pouvant entraîner une surinfection et une perforation. Des hémorragies massives nécessitant des transfusions sanguines sont rencontrées chez 3% des malades. La survenue d'un cancer

colique est généralement précédée d'une dysplasie sévère. Le risque de développer un carcinome dépend de la durée de la maladie et de son degré d'extension au colon.

L'exclusion d'une colite infectieuse est réalisée par un examen coprologique. Ensuite le diagnostic repose sur l'endoscopie, le lavement baryté et l'histologie. La colonoscopie met en évidence une hyperémie de la muqueuse saignant au contact ou des ulcérations dans les cas plus sévères. Un syndrome inflammatoire et une anémie sont mis en évidence par une biologie sanguine.

### **3- Traitement des MICI**

#### **3.1- La maladie de Crohn (MC)**

Le traitement de la maladie de Crohn dépend essentiellement de la sévérité de la maladie, de sa localisation, des complications et de la réponse aux précédentes thérapeutiques. Le but est de contrôler l'inflammation, de corriger les déficiences nutritives, et de palier aux symptômes tels que douleurs abdominales, diarrhées et rectorragie.

Le traitement symptomatique comprend des anti-diarrhéiques, des spasmolytiques, des pansements intestinaux et une alimentation sans résidus. Le suivi diététique et nutritionnel est important pour limiter les intolérances alimentaires et palier à une malnutrition. Durant les phases actives de la maladie une alimentation entérale liquide est utilisée, faisant place à une alimentation parentérale totale temporaire dans les formes graves.

Le traitement conventionnel implique en première approche les aminosalicylés qui diminuent l'inflammation intestinale. Dans les formes sévères, l'inflammation peut être contrôlée par des corticostéroïdes (Otley *et al.*, 2005). Etant donné l'apparition d'effets secondaires et de cortico-dépendance, les corticostéroïdes sont prescrits pour une période courte et pas en traitement d'entretien.

En cas de cortico-résistance, cortico-dépendance ou de formes fistulisantes, un traitement par immunomodulateurs (azathioprine, méthotrexate) peut être envisagé.

Les thérapies biologiques telles que des antagonistes et anticorps dirigés contre des interleukines ou contre le « tumornecrosis factor alpha » (TNF $\alpha$ ) sont testées dans le cadre d'études randomisées. Actuellement, seul l'Infliximab (IFX) (un anticorps chimérique anti-TNF $\alpha$ ) est utilisé dans le traitement de la maladie de Crohn active et réfractaire à d'autres

traitements et dans les formes fistulisantes (Kuhbacher *et al*, 2007). Deux autres anti-TNF $\alpha$ , l'adalimumab et le certolizumabpegol sont proches de la commercialisation.

Le traitement chirurgical est proposé en cas d'échec du traitement médical et en présence de complications chroniques ou aiguës (perforations).

Des antibiotiques tels que le metronidazole ou la ciprofloxacine sont efficaces dans les localisations ano-périnéales de la MC.

### **3.2- La recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH)**

Le traitement médical de la RCUH est similaire à celui de la maladie de Crohn. Le traitement chirurgical est indiqué lors d'une hémorragie sévère ne répondant pas au traitement, d'un mégacolon toxique, d'une perforation, d'une RCUH réfractaire au traitement médical ou du développement d'une dysplasie sévère ou d'un cancer colique. Depuis peu, l'Infliximab (IFX, IgG1 chimérique anti-TNF $\alpha$ ) est également indiqué dans les cas réfractaires aux autres traitements.

## **III- LE CANCER COLORECTAL (CCR)**

Le terme de « cancer » recouvre un large éventail de maladies différentes qui présentent néanmoins certaines caractéristiques communes :

- Des cellules normales au départ se multiplient de façon incontrôlée; elles prolifèrent et se transforment en cellules cancéreuses.
- Les cellules cancéreuses envahissent le tissu sain; elles le compriment et le détruisent.
- Certaines de ces cellules peuvent se détacher de l'endroit où elles se sont constituées et donner naissance à des foyers secondaires dans d'autres parties du corps : les métastases.

Le terme de «cancer» désigne donc la prolifération de cellules qui se multiplient de façon incontrôlée et qui envahissent le tissu sain. Dans le langage courant, on parle aussi de tumeur. Il faut toutefois distinguer les tumeurs bénignes, qui ne mettent pas la vie en danger, des tumeurs malignes, qui peuvent menacer l'existence. Les tumeurs malignes sont aussi appelées néoplasmes, ce qui signifie «nouvelle formation».

Il existe plus de deux cents types de cancers différents. On distingue les tumeurs solides, qui se développent à partir des cellules d'un organe et qui forment une masse ou un nodule (c'est le cas du cancer du côlon et du rectum), et les cancers qui prennent naissance dans le système sanguin ou lymphatique (les leucémies, par ex.). Ceux-ci peuvent notamment se traduire par un gonflement des ganglions lymphatiques, mais aussi par des modifications des paramètres sériques.

Les tumeurs malignes solides qui se forment à partir de tissus superficiels comme la peau, les muqueuses ou les glandes sont appelées carcinomes. Le cancer ou carcinome du côlon et du rectum se classe dans cette catégorie. Les carcinomes représentent la grande majorité des tumeurs malignes. Les tumeurs malignes solides qui se développent dans le tissu conjonctif, le tissu adipeux, les cartilages, les muscles, les os ou les vaisseaux sont qualifiées de sarcomes (Lanz et Schlumpf, 2015).

On appelle cancers colorectaux (CCR) les cancers qui se forment dans les cellules qui tapissent l'intérieur du côlon (la partie la plus longue du gros intestin) et du rectum (les derniers centimètres du gros intestin avant l'anus). Le côlon et le rectum constituent le gros intestin, qui est la dernière partie de l'appareil digestif. L'appareil digestif, qui est constitué de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin, extrait et transforme les substances nutritives (vitamines, sels minéraux, sucres, graisses et protéines) présentes dans les aliments, et facilite l'élimination des déchets de l'organisme. Ce qu'il est important de savoir au sujet du CCR, c'est qu'il débute habituellement par une tumeur précancéreuse appelée polype et qu'il se développe lentement, habituellement de façon prévisible. Le dépistage permet donc de le prévenir et il est souvent possible de le guérir s'il est diagnostiqué à temps.

### **1- L'apparition d'un cancer colorectal**

Les cancers colorectaux peuvent se développer à partir de différentes cellules. Plus de 95% d'entre eux apparaissent toutefois dans la muqueuse du côlon et du rectum. Environ 5% des maladies cancéreuses colorectales se développent à partir d'autres types de cellules (que celles de la muqueuse intestinale).

Le renouvellement constant des cellules de la muqueuse intestinale peut conduire à une surproduction cellulaire. Chez les personnes de plus de 40 ans en particulier, ce phénomène peut entraîner la formation de polypes, des excroissances bénignes

de la muqueuse qui grandissent lentement et en continu. On les appelle aussi adénomes parce qu'elles se développent à partir de cellules glandulaires.

Bien qu'ils soient bénins dans la plupart des cas, on classe les polypes dans les stades précancéreux. En effet, avec le temps, ils peuvent évoluer en tumeur maligne dénommée adénocarcinome. Cette tumeur s'infiltré alors progressivement dans les différentes couches de tissus de l'intestin (Lanz et Schlumpf, 2015).

## **2- Diagnostic du cancer colorectal**

Le cancer du côlon peut rester longtemps asymptomatique. Il est souvent précédé d'une tumeur bénigne : l'adénome (ou polype). En grossissant, en particulier au-delà de 1 cm de diamètre, le risque qu'il se transforme en cancer devient plus important. C'est au stade de polype que le dépistage doit se faire, sans attendre. Mais certains symptômes peuvent également attirer l'attention et conduire à une consultation médicale :

- Troubles du transit intestinal : constipation soudaine ou qui s'aggrave, diarrhée qui se prolonge ou alternance de diarrhée et de constipation.
- Sang visible dans les selles, que l'on attribuera trop facilement à des hémorroïdes.
- Douleurs abdominales à type de coliques, évoluant par crises de 2 ou 3 jours, accompagnées parfois de gargouillements abdominaux.
- Amaigrissement inexplicable et/ou une petite fièvre persistante.

Le diagnostic se fait :

- Pour le cancer du côlon : par la coloscopie totale, sous anesthésie générale brève, qui permet de visualiser la lésion, de réaliser des biopsies et d'enlever la plupart des polypes observés.
- Pour le cancer du rectum, plus accessible : le diagnostic est fait par l'examen clinique grâce au toucher rectal et par la rectoscopie qui permet des biopsies. Cet examen doit être complété par une coloscopie.

Si un cancer est détecté, on appréciera son étendue par d'autres examens : échographie endorectale, radiographies, scanner ou IRM à la recherche de métastases ganglionnaires, pulmonaires ou hépatiques, et divers examens biologiques hépatiques (examens de sang) dont le dosage de l'Antigène Carcino Embryonnaire (ACE).

### 3- Classification du cancer colorectal

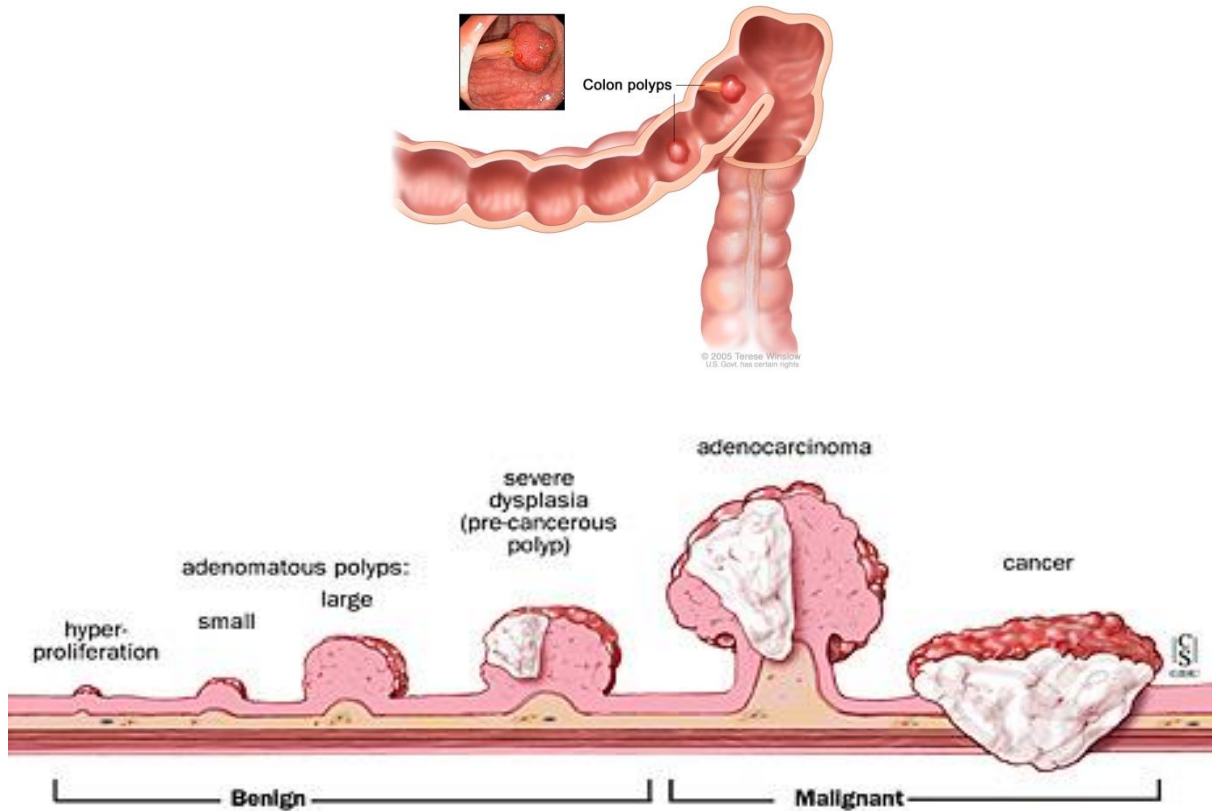
La classification internationale TNM sert de base pour décrire le stade d'une maladie cancéreuse.

**Tableau 1** : classification TNM (Lanz et Schlumpf, 2015).

<b>T</b>	correspond à «tumeur». Les chiffres de 0 à 4 permettent de décrire sa taille et son étendue. Plus le chiffre est élevé, plus la tumeur s'est propagée (voir illustration ci-dessus).
<b>Tis</b>	signifie tumeur «in situ», limitée à la muqueuse.
<b>T1</b>	La tumeur s'infiltré dans la sous-muqueuse
<b>T2</b>	La tumeur s'infiltré dans la couche musculuse de l'intestin.
<b>T3</b>	La tumeur s'infiltré à travers toutes les couches de l'intestin.
<b>T4</b>	La tumeur s'infiltré dans les tissus ou dans les organes avoisinants.
<b>N</b>	correspond aux ganglions lymphatiques (nodes en anglais).
<b>N0</b>	Les ganglions sont intacts.
<b>N1</b>	Jusqu'à trois ganglions avoisinant sont atteints.
<b>N2</b>	Plus de trois ganglions sont touchés. L'ajout de lettres minuscules permet de préciser les résultats, par exemple <b>N2a</b> signifie que quatre à six ganglions lymphatiques sont atteints.
<b>M</b>	correspond aux métastases. Dans le cancer colorectal, les plus fréquentes se forment dans le foie et dans le poumon. Elles sont plutôt rares dans les os ou le cerveau.
<b>M0</b>	On ne détecte pas de métastases.
<b>M1</b>	M1 La tumeur a formé des métastases dans d'autres organes. Il est possible de préciser les résultats en ajoutant des lettres minuscules: <b>M1b</b> signifie par exemple que des métastases ont atteint plus d'un organe.

#### 4- Stades du cancer colorectal :

Les stades du CCR décrivent la taille de la tumeur, à quelle profondeur elle a pénétré dans la paroi du côlon ou du rectum et si le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques ou à d'autres endroits du corps au-delà du lieu où il est d'abord apparu. (**Figure 6**) :



**Figure 6** : Stades du cancer colorectal

- **Stade 0** : **Tis**, les cellules anormales sont localisées dans le revêtement interne (muqueuse) du côlon ou du rectum. Ces cellules peuvent devenir cancéreuses et se propager. Le stade 0 du CCR est aussi appelé carcinome in situ.
- **Stade 1** : Extension de la tumeur jusqu'à **T2**, pas d'atteinte des ganglions lymphatiques, pas de métastases détectables. La tumeur s'est propagée dans la paroi interne du côlon ou du rectum mais ne l'a pas traversée.
- **Stade 2** : **T3** ou **T4**, pas d'atteinte des ganglions lymphatiques, pas de métastases détectables. La tumeur s'est propagée plus profondément dans la paroi du côlon



ou du rectum ou l'a traversée. Elle peut envahir les tissus environnants, mais elle n'a pas atteint les ganglions lymphatiques.

- **Stade 3: T1 à T4**, atteinte des ganglions lymphatiques jusqu'à **N2**, pas de métastases détectables. Le cancer a atteint les ganglions lymphatiques proches, mais ne s'est pas propagé à d'autres parties du corps.
- **Stade 4: T1 à T4**, atteinte des ganglions lymphatiques jusqu'à **N2**, présence de métastases (**M1**). Le cancer s'est propagé à d'autres parties du corps comme le foie ou les poumons.

#### 5- Grades du cancer colorectal :

En plus du stade du cancer, il est également utile de déterminer son grade. Pour déterminer le grade d'un cancer, on examine un prélèvement de biopsie au microscope. On détermine le grade en comparant l'apparence et le comportement des cellules cancéreuses à ceux de cellules normales, ce qui permet au médecin d'évaluer la rapidité de la croissance du cancer. Le cancer colorectal a trois grades :

- **1<sup>er</sup> grade (bas)** : La croissance du cancer est lente; on dit également que le cancer est bien différencié.
- **2<sup>ème</sup> grade (modéré)** : La croissance du cancer est intermédiaire; on parle aussi de différenciation intermédiaire.
- **3<sup>ème</sup> grade (haut)** : La croissance du cancer est plus rapide; le cancer est alors dit peu différencié.

#### 6- Traitement du cancer colorectal :

Le traitement du CCR dépendra de l'état de santé général, ainsi que du type, du stade et du grade du cancer.

Pour le cancer colorectal, le traitement pourrait comprendre une combinaison de chirurgie, de radiothérapie, de chimiothérapie et de thérapie ciblée. Le traitement comprend une ou plusieurs des approches suivantes :

### **6.1- La chirurgie :**

La chirurgie constitue le principal traitement du CCR. On a recours à la chirurgie pour soigner le cancer aux stades précoces en retirant complètement la tumeur et les tissus affectés.

Il arrive qu'une intervention chirurgicale soit proposée à des personnes dont les tumeurs ont récidivé dans le bassin ou se sont propagées dans le foie ou les poumons. On peut aussi avoir recours à la chirurgie pour les personnes dont le cancer ne peut pas être entièrement éliminé, aux fins de soulagement des symptômes de la maladie.

Ce sont la taille de la tumeur et son emplacement (l'endroit de l'intestin où elle se situe) qui déterminent le type de chirurgie qui convient à chaque personne. Différentes interventions chirurgicales sont pratiquées pour retirer les tumeurs en fonction de leur taille, de leur emplacement, de la profondeur à laquelle elles ont pénétré dans la paroi du côlon ou du rectum, et de la longueur du segment du côlon ou du rectum qui doit être retirée.

Pour l'ablation des petits cancers précoces comme les polypes cancéreux, un tube (une sonde) est inséré dans le rectum, alors que, pour l'ablation de tumeurs plus grosses, il est généralement nécessaire de retirer la portion d'intestin où se trouve le cancer.

Si un segment d'intestin est enlevé, les parties restantes saines de l'intestin sont recousues ensemble. Si cela ne peut pas être fait immédiatement, on pratique parfois une colostomie temporaire qui consiste à faire une ouverture dans l'abdomen et d'y amener le côlon pour le faire déboucher à l'extérieur du corps. Cela permet à l'organisme d'évacuer directement les déchets du côlon à travers l'ouverture pratiquée dans la peau, dans un sac qui peut être vidé régulièrement.

Chaque personne étant différente, la colostomie peut être permanente pour certaines, alors que d'autres n'en auront besoin qu'en attendant la guérison du site de l'opération et, après 2 ou 3 mois, la colostomie pourra être supprimée (Goldberg, 1998).

### **6.2- La radiothérapie :**

On peut avoir recours à deux types de radiothérapie : la radiothérapie externe et, occasionnellement, la curiethérapie ou brachythérapie. Dans la radiothérapie externe, le faisceau de rayons est dirigé sur la tumeur. Dans la curiethérapie, l'élément radioactif est placé à l'intérieur de la tumeur, ce qui permet de traiter le cancer de façon très focalisée.

Au cours d'une radiothérapie, des doses élevées d'un type spécial d'énergie (sous forme de rayonnements) sont dirigées vers l'endroit où le cancer se développe dans le but de détruire les cellules en rendant impossibles leur croissance et leur division. La radiothérapie détruit les cellules cancéreuses dont la croissance est incontrôlable, mais elle peut également endommager les cellules saines environnantes. Heureusement, les cellules saines sont capables de se régénérer après la fin de la thérapie.

La radio-chimiothérapie (aussi appelée chimioradiation) est une chimiothérapie associée à une radiothérapie. Ce traitement est utilisé avant la chirurgie en cas de cancer du rectum pour améliorer les chances de contrôle de la tumeur et réduire les récurrences locales (retour du cancer) (Sauer et al, 2004 ; Smalley et al, 2006).

### **6.3- La chimiothérapie :**

Des médicaments sont habituellement utilisés pour traiter les différents stades du CCR. On appelle chimiothérapie l'administration de médicaments anticancéreux (médicaments chimiothérapeutiques) qui sont injectés d'ordinaire par piqûre ou par perfusion intraveineuse, ou parfois en pilule, pour détruire les cellules cancéreuses.

Bien que les médicaments chimiothérapeutiques agissent en détruisant les cellules cancéreuses et en empêchant leur croissance et leur prolifération, ils endommagent aussi des cellules saines, et peuvent provoquer des effets secondaires. Cependant, l'atteinte des cellules saines est temporaire; elles se régénèrent d'elles-mêmes une fois le traitement terminé.

Les effets secondaires possibles sont les nausées, les vomissements, les aphtes (stomatite ou mucite), c'est-à-dire une inflammation de la muqueuse buccale, la perte d'appétit, la fatigue, l'alopécie (perte des cheveux), la diarrhée, la neurotoxicité, le risque accru d'infection et le saignement.

Le traitement chimiothérapeutique peut être administré avant ou après la chirurgie, ou les deux :

- **Avant la chirurgie (préopératoire)**: (Chimiothérapie néoadjuvante/chimioradiation)  
Administrée pour réduire la taille de la tumeur et limiter la propagation locale.
  
- **Après la chirurgie (post-opératoire)**:
  - **Chimiothérapie adjuvante**: Administrée pour détruire les cellules cancéreuses microscopiques restant après l'opération et aider à réduire le risque de récurrence du cancer.
  - **Chimiothérapie palliative**: Administrée pour aider à ralentir et à contrôler le cancer lorsqu'il s'est propagé à des organes distants. L'objectif est de réduire les symptômes et de prolonger la vie, mais, en dernière analyse, le cancer est incurable.

#### **6.4- L'immunothérapie (thérapie ciblée) :**

L'immunothérapie est actuellement l'un des axes de recherche les plus prometteurs en oncologie. Elle consiste à stimuler par différents traitements le système immunitaire afin de lui permettre de combattre les cellules tumorales (Ducreux, 2016).

La thérapie ciblée est une autre méthode qui peut aider à traiter le CCR. Les médicaments utilisés dans le cadre de la thérapie ciblée ont pour but de combattre et d'attaquer les cellules cancéreuses sans nuire aux cellules normales.

La thérapie aux anticorps monoclonaux est une forme de thérapie ciblée utilisée pour traiter le CCR. Elle fait appel à des anticorps fabriqués en laboratoire à partir d'un seul type de cellule du système immunitaire. Ces anticorps peuvent trouver des substances sur les cellules cancéreuses ou des substances normales susceptibles de favoriser la croissance des cellules cancéreuses, se lier à ces substances et détruire les cellules cancéreuses, bloquer leur croissance ou les empêcher de se propager.

Les médicaments de thérapie ciblée les plus couramment utilisés sont le bévacicumab (Avastin®), le cétuximab (Erbix®) et le panitumumab (Vectibix®), qui sont tous des anticorps monoclonaux

Après le mélanome et le cancer du poumon, cette nouvelle voie thérapeutique commence à se développer en cancérologie digestive. Les chercheurs mènent actuellement plusieurs études pour évaluer l'intérêt de l'immunothérapie sur le cancer colorectal. Parmi elles, une étude initiée fin 2013, a permis d'évaluer une nouvelle immunothérapie anti-PD-L1 (Programmed death-ligand 1), le durvalumab, chez 500 patients touchés par différents types de cancer (côlon, peau et poumon).

Ces traitements semblent très prometteurs pour certains types de cancers du côlon, mais aussi dans d'autres pathologies cancéreuses digestives (Ducreux, 2016).

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

# **Chapitre I**

## **Matériels Biologiques et Extraits**

## I- INTRODUCTION

*Helix aspersa* (Muller, 1774), appelé communément « petit gris » et décrit par le zoologue danois Otto Friedrich Müller en 1774, est une espèce d'escargot très répandue sur la façade méditerranéenne algérienne. Son aire de répartition éco-biogéographique s'étend surtout dans les pays méditerranéens de l'Europe, de l'Afrique du nord et du Moyen Orient. On le trouve aussi dans l'Amérique Latine, particulièrement en Chili et en Argentine et dans l'Afrique du sud. Il s'agit d'un escargot très éclectique, qui s'adapte à n'importe quelle condition climatique. De ce fait, il présente un grand polymorphisme dans la forme, dans la dimension et dans la coloration de la coquille (Avagnina, 2009). La coloration et le système de bandes de la coquille sont d'origine génétique mais le biotope a peut-être une action secondaire sur leur variation (Chevallier, 1977).

Le Petit-Gris mesure entre 2,8 et 3,5 cm pour un poids adulte compris entre 7 et 15 g. Il porte une coquille calcaire, globuleuse, ventrue, très convexe en dessus, bien obliquement bombée en dessous à motifs variables mais le plus souvent brune rayée de noir (1 à 4 bandes sombres). Spire un peu haute, de 4 à 5 tours à croissance rapide ; solide, un peu mince (Chase, 1986). La couleur de la chaire est verdâtre tirant sur le sombre, mais elle devient plus claire lorsque l'escargot est en captivité (Avagnina, 2009).



**Figure 7:** *Helix aspersa* (Petits gris) (Keita A.1997)



*Helix aspersa* est une espèce herbivore, qui s'alimente la nuit de végétaux variés. C'est un animal hermaphrodite à reproduction croisée de 5 ans de longévité. Sa position systématique est la suivante :

<b>Règne :</b>	Animalia
<b>Sous règne :</b>	Metazoa
<b>Embranchement :</b>	<u>Mollusca</u>
<b>Classe :</b>	Gasteropoda
<b>Sous classe :</b>	<u>Orthogasteropoda</u>
<b>Super ordre :</b>	<u>Heterobranchia</u>
<b>Ordre :</b>	<u>Pulmonata</u>
<b>Sous ordre :</b>	Srylommatophora
<b>Super famille :</b>	Helicacea
<b>Famille :</b>	<u>Helicidae</u>
<b>Genre :</b>	<u><i>Helix</i></u>
<b>Espèce :</b>	<i>aspersa</i> (Muller 1774)

Des échantillons de l'escargot *Helix aspersa* ont été collectés pendant l'hiver au niveau de la région de Zeghaia, centre-est de la wilaya de Mila. Il s'agit d'escargots d'élevage (en hibernation) destinés à l'exportation pour la gastronomie, alimentés préalablement de farine et de laitue. L'hibernation permet de vider complètement les intestins des escargots et d'éliminer tout effet des composantes végétales consommées auparavant. Ces escargots ont été soumis à une analyse microbiologique au niveau du Laboratoire Vétérinaire Régionale de Constantine, Institut National de la Médecine Vétérinaire (Annexe 1).

## II- MATERIELS ET METHODES

### 1- Préparation des extraits

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à trois extraits de l'escargot *Helix aspersa* : la bave, l'homogénat et un extrait aqueux préparé à partir de l'homogénat.

#### 1.1- Extraction et préparation de la bave

L'extraction de la bave nécessite de stresser l'escargot pour avoir le meilleur rendement, souvent en posant une pile de 9V quelques minutes sur l'escargot. Par ailleurs, il est nécessaire d'ajouter des stabilisants pour stabiliser le mucus. Pour ne pas faire souffrir l'animal, on a utilisé le moyen le plus simple en héliciculture. Ce dernier nous permet d'avoir une bave pure. Avec un bâtonnet en bois stérile, on stimule l'escargot au niveau du pied. Ce dernier commence à sécréter la bave qu'on récolte dans une boîte stérile et qu'on conserve à -20°C jusqu'à utilisation. Pour son utilisation, on doit décongeler la bave, centrifuger à 5000 tr/min pendant 10 min, puis récupérer le surnageant qui sera utilisé dans nos expérimentations.

#### 1.2- Préparation de l'homogénat

Après abattage et élimination de la coquille et des viscères, les parties charnues de l'escargot (pied et tête) sont récupérées, nettoyés par une solution NaCl 12 ‰ pour éliminer toute la bave, puis broyés et homogénéisés. L'homogénat obtenu a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

#### 1.3- Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux est préparé à partir de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa*. L'homogénat frais est réparti dans des boîtes de pétri (8g/boîte), congelé à -20°C puis lyophilisé. Le lyophilisat est mis en macération dans une solution NaCl 9 ‰ pendant 24h à 40°C sous agitation. L'extrait ainsi obtenu est filtré puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

## **2- Caractérisation des extraits**

### **2.1- Composition chimique de la bave (Bonnemain, 2003)**

#### **2.1.1- Allantoïne**

L'allantoïne est un composé chimique azoté, de formule  $C_4H_6N_4O_3$ . D'origine organique ou végétale, elle soigne les plaies et les brûlures, a des vertus adoucissantes et anti-acnéiques. Elle ralentit le processus de vieillissement cutané.

#### **2.1.2- Elastine**

L'élastine est une protéine sécrétée par les fibroblastes et a des propriétés élastiques, ce qui permet aux cellules de se lier et aux tissus biologiques de se former. C'est une chaîne polypeptidique longue de 830 acides aminés, elle est constituée majoritairement de prolines et de glycines. C'est un allié indispensable de la souplesse et de l'élasticité de la peau, Il gomme les rides, réduit les vergetures et atténue l'acné.

#### **2.1.3- Collagène**

Le collagène est une protéine qui confère aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Il est inextensible et résiste bien à la traction et est également indispensable à la cicatrisation.

#### **2.1.4- Vitamines A, C et E**

Elles ont un pouvoir protecteur, nourrissant, anti-inflammatoire et antioxydant pour les vitamines C et E.

#### **2.1.5- Autres composants**

Tels que les peptides antimicrobiens qui sont des antiseptiques naturels détruisant les bactéries, les glycoprotéines enzymatiques qui ont une action réparatrice favorisant la régénération de la peau animale (traitements des cicatrices), l'acide glycolique qui aide à détruire les bactéries et stimule la production de collagène.

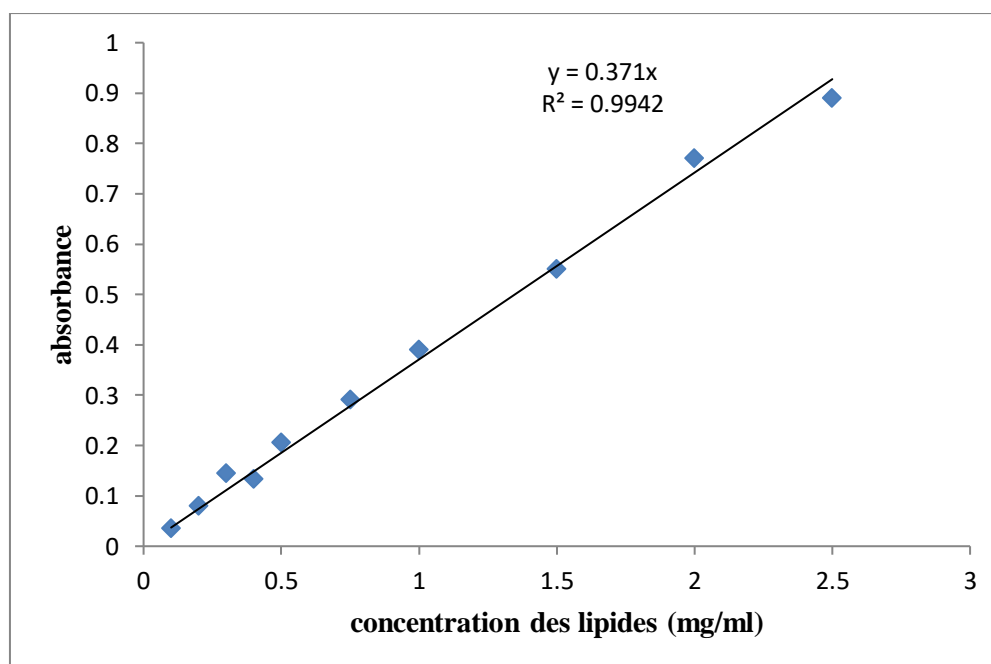
## 2.2- Composition chimique de l'homogénat et l'extrait aqueux

Pour la caractérisation des substances contenues dans l'extrait aqueux (et par conséquent dans l'homogénat), 2.5g du lyophilisat ont été ajoutés à 100ml d'un mélange de chloroforme, hexane (2/1 v/v). La solution a été centrifugée à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant a été récupéré pour le dosage des lipides. Le culot (après évaporation du chloroforme et de l'hexane) a été ajouté à 100 ml d'eau ultra pure et laissé macérer pendant 24h à 40°C sous agitation. Après 24h, la solution a été centrifugée à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant obtenu a servi pour le dosage des : protéines, sucres totaux, acides uroniques, sucres sulfatés et polyphénols (Pierre, 2010).

### 2.2.1- Dosage des lipides

Après centrifugation, le surnageant a servi pour le dosage des lipides. Ces derniers, à chaud et en milieu sulfo-phosphorique, développent avec la vanilline une coloration rose dosable au spectrophotomètre, en se basant sur une gamme étalon d'huile de tournesol (concentrations de 0 à 5 mg/ml).

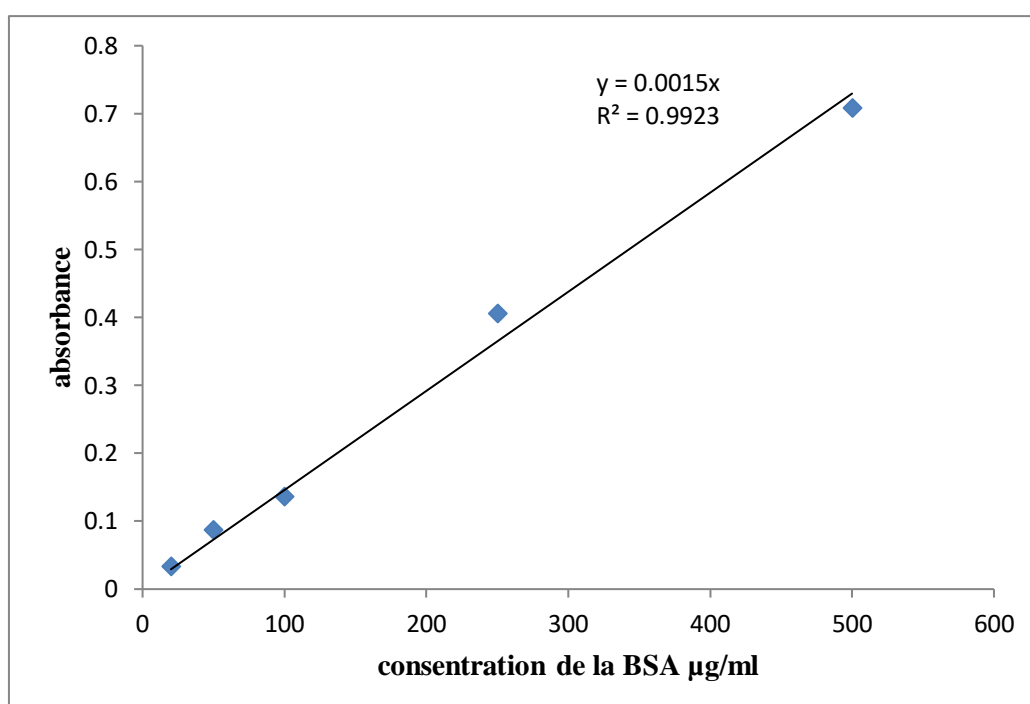
Cette méthode, mise en évidence par Chabrol et Charonnat (1937), est couramment utilisée dans le dosage des lipides sans extraction préalable. (Drevon & Schmit 1964, Crheange & Metais 1972, Reversat1976).



**Figure 8 :** Gamme d'étalonnage de l'huile de tournesol

### 2.2.2- Dosage des protéines totales

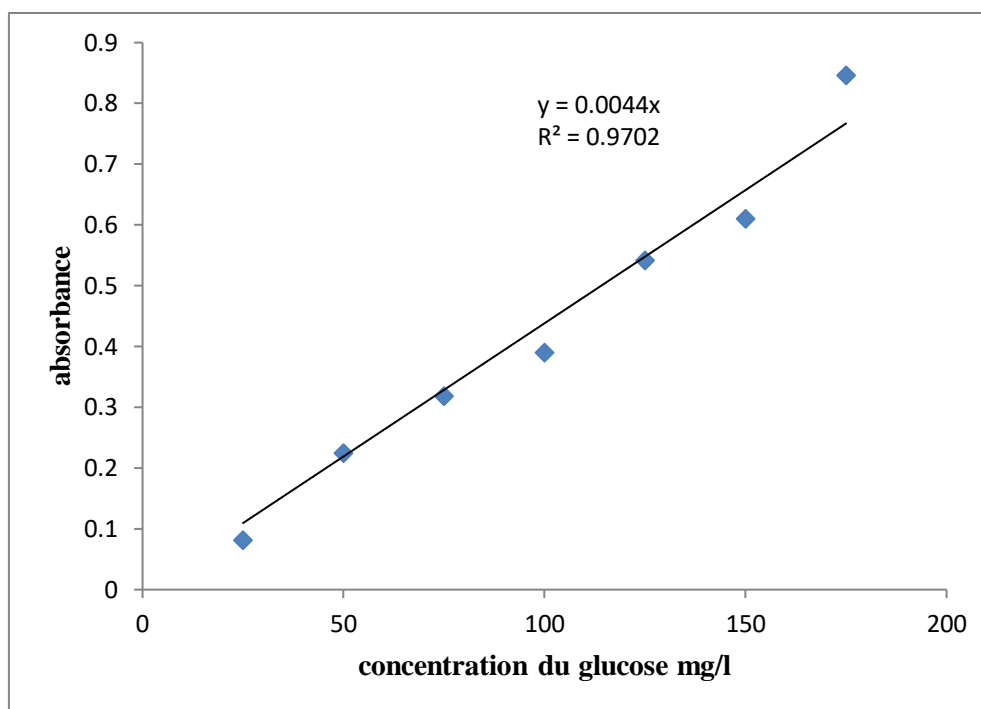
La quantité de protéines présentes dans le culot a été déterminée via l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Bradford et al. (1976). Cette méthode est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. C'est une méthode de dosage colorimétrique qui permet de déterminer la concentration de protéines grâce à une gamme étalon de BSA (concentrations de 0 à 1000 µg/ml).



**Figure 9** : Gamme d'étalonnage de l'albumine de sérum bovin

### 2.2.3- Dosage des sucres totaux

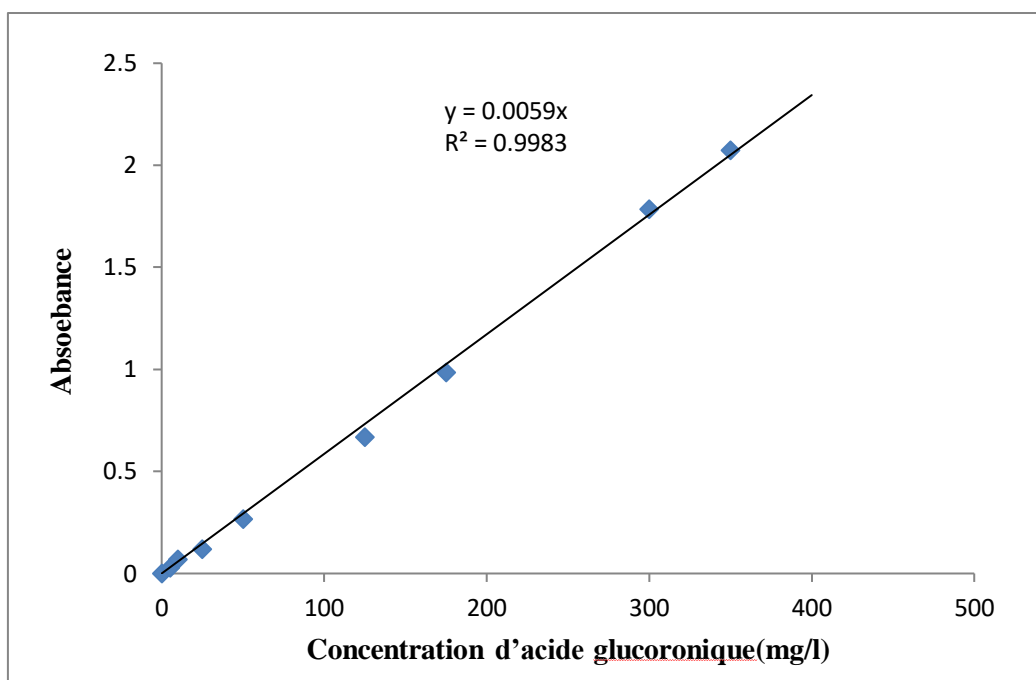
La composition en sucre totaux a été déterminée via l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Dubois et al. (1956). Sous l'action d'acide minéraux concentrés et à chaud, les hexoses et pentoses du milieu subissent une déshydratation suivie d'une cyclisation (Pierre, 2010). La formation d'un complexe jaune-rouge permet de suivre la concentration en sucres totaux par spectrophotométrie, en se basant sur les résultats obtenus de la gamme étalon de glucose.



**Figure 10 :** Gamme d'étalonnage du glucose.

#### 2.2.4- Dosage des acides uroniques

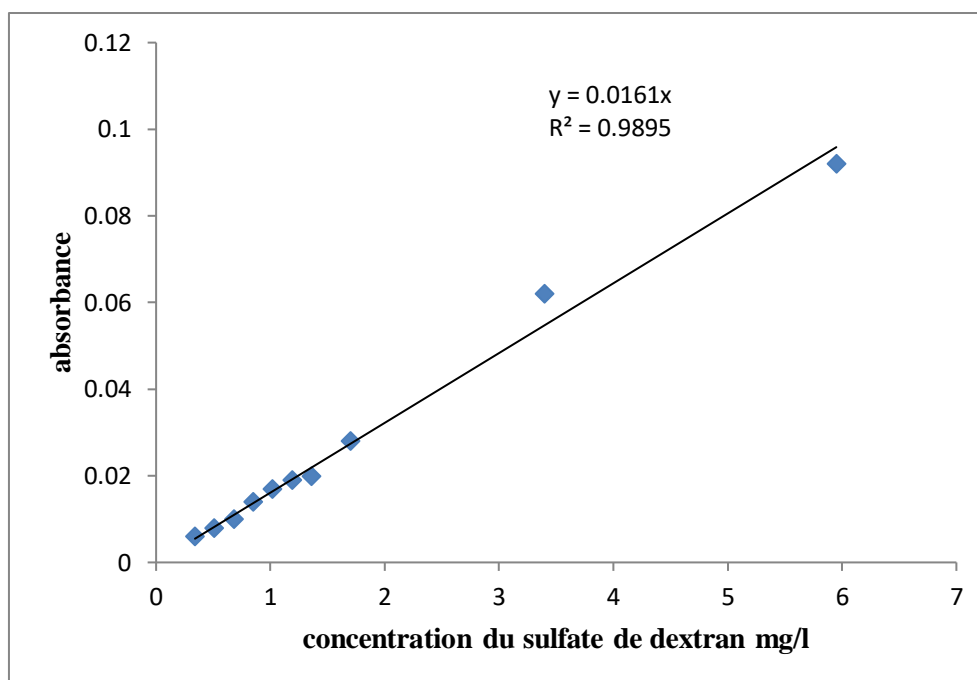
La composition en acides uroniques a été déterminée grâce à l'utilisation de la méthode développée par Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-cozzy et al. (1991). Sous l'action des acides minéraux concentrés et à chaud, les acides uroniques du milieu subissent une déshydratation suivie d'une cyclisation aboutissant à la formation d'un chromophore de couleur rose. La réalisation d'une gamme étalon d'acide glucuronique a aidé à déterminer la concentration des acides uroniques.



**Figure 11** : Gamme d'étalonnage de l'acide glucuronique

### 2.2.5- Dosage des sucres sulfatés

La quantité de sucres sulfatés présente dans le milieu a été déterminée par la méthode de dosage colorimétrique développée par Jack et al. (1968). En phase aqueuse, le 3-amino-7-diméthylamino-phénouthizin-5-ium chloride (Azur A), va complexer les sulfates pouvant être présents, notamment au sein de polysaccharides (Pierre, 2010). Le milieu va développer une couleur rose-violet, la concentration des sucres sulfatés du milieu a été décelée à l'aide d'une gamme étalon de sulfate de dextran.

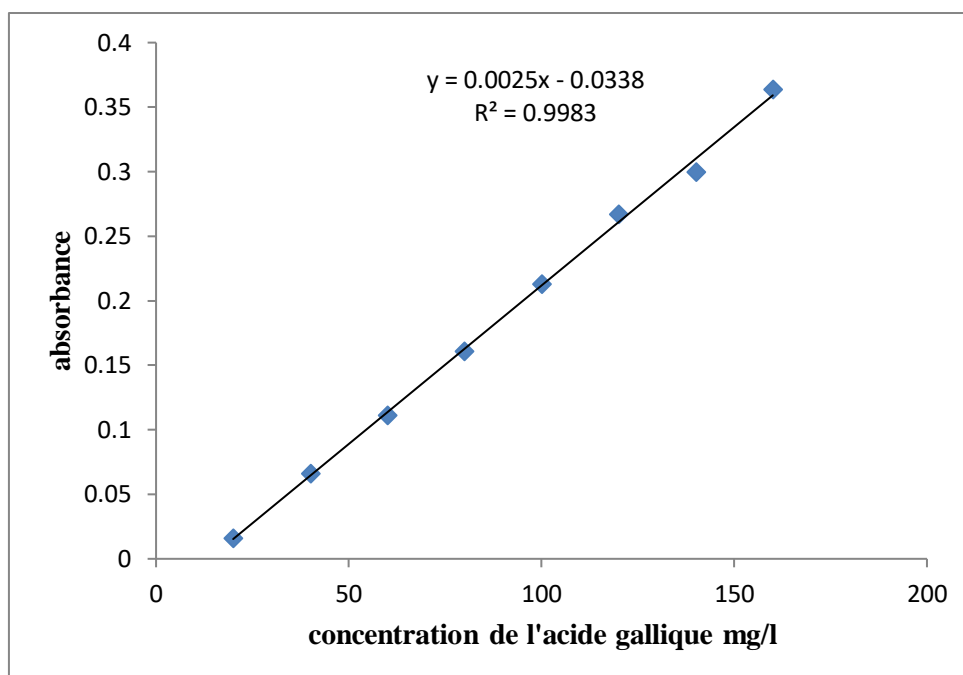


**Figure 12 :** Gamme d'étalonnage du sulfate de dextran

### 2.2.6- Dosage des polyphénols

Les composés phénoliques de l'extrait aqueux sont dosés selon la méthode de Sinleton et Rossi (1965). Ce dosage non spécifique s'effectue à partir des extraits aqueux. Le réactif de Folin- Ciocalteu voit ces propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction -OH des phénols (Catalano*et al.*, 1999). Cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée, qui passe une absorption maximale aux environs des 725nm permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues d'acide gallique.





**Figure 13 :** Gamme d'étalonnage de l'acide gallique

A partir des différents dosages précédents, on a pu estimer la concentration en mg/ml et le pourcentage de quelques composants contenus dans la chaire de l'escargot *Helix aspersa*. Cette estimation est représentée par le **Tableau 3** et la **Figure 14**.

### 3- Estimation de la toxicité des extraits

Une étude de la toxicité de la bave et de l'homogénat a été établie selon un protocole de (Amiard, 2011) pendant 15 jours sur des souris *Mus musculus*, de poids corporel entre 25 et 30g. Cette étude a été établie sur 6 lots de souris (10 souris/lot). 3 lots ont reçu, par gavage, différentes doses de bave et les 3 autres, différentes doses d'homogénat :

**Tableau 2 :** traitement des souris par différentes doses de bave et d'homogénat

Lot	Bave			Homogénat		
	1	2	3	4	5	6
	20 ml/Kg	26.6 ml/Kg	33.3 ml/Kg	4 g/Kg	4,5 g/Kg	5g /Kg
<b>doses</b>	=	=	=	=	=	=
	600	800	1000	120	140	160
	µl/souris	µl/souris	µl/souris	mg/souris	mg/souris	mg/souris

Des observations ont été établies chaque jour après gavage de 30min, 1h, 5h et 24h, ainsi que la température et le poids des souris ont été pris et cela durant 15 jours.

### Analyse statistique :

L'étude statistique a été réalisée par l'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de comparaison de Dunnett's, en utilisant l'outil statistique XLSTAT 2013 pour Windows Office. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type, avec un seuil de signification statistique fixé à 5%.

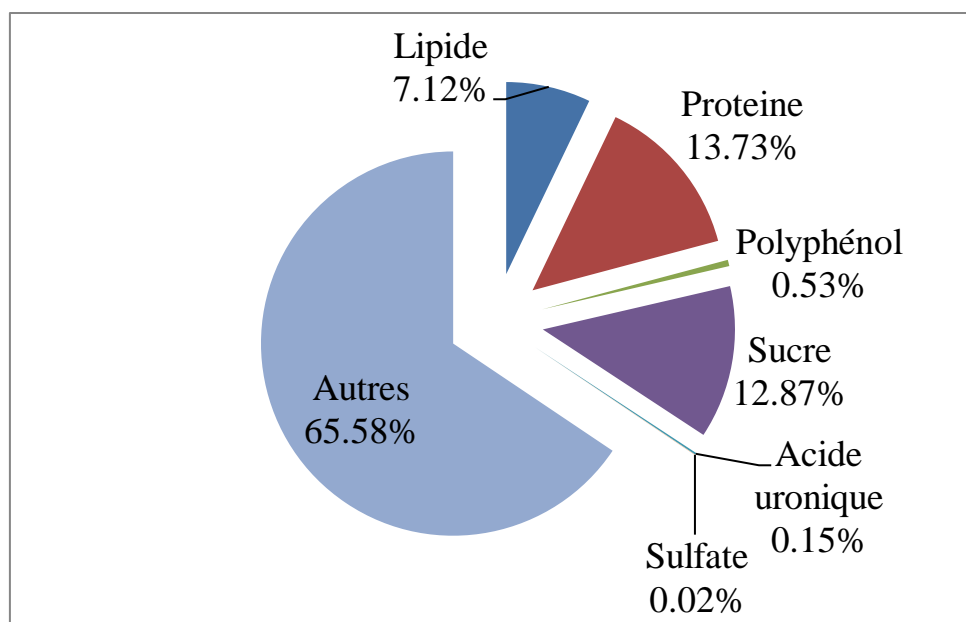
## III- RESULTATS

### 1- Caractérisation des extraits

A partir des différents dosages et à l'aide des différentes gammes étalon, on a pu estimer la concentration en mg/ml et le pourcentage de quelques composants contenus dans la chaire de l'escargot *Helix aspersa*. Cette estimation est représentée par le **Tableau 3** et la **Figure 14**.

**Tableau 3** : concentrations et pourcentages des substances dosées dans l'extrait aqueux d'*Helix aspersa* (mg/ml)

	Concentrations (mg/ml)	Pourcentages (%)
<b>Lipides</b>	1,778975741	7,11590296
<b>Protéines</b>	3,433333333	13,7333333
<b>Polyphénols</b>	0,132	0,528
<b>Sucres totaux</b>	3,218181818	12,8727273
<b>Acide uroniques</b>	0,037181818	0,14872727
<b>Sulfates</b>	0,005341615	0,02136646



**Figure 14 :** Proportions des différents composés dans l'extrait d'escargot *Helix aspersa*

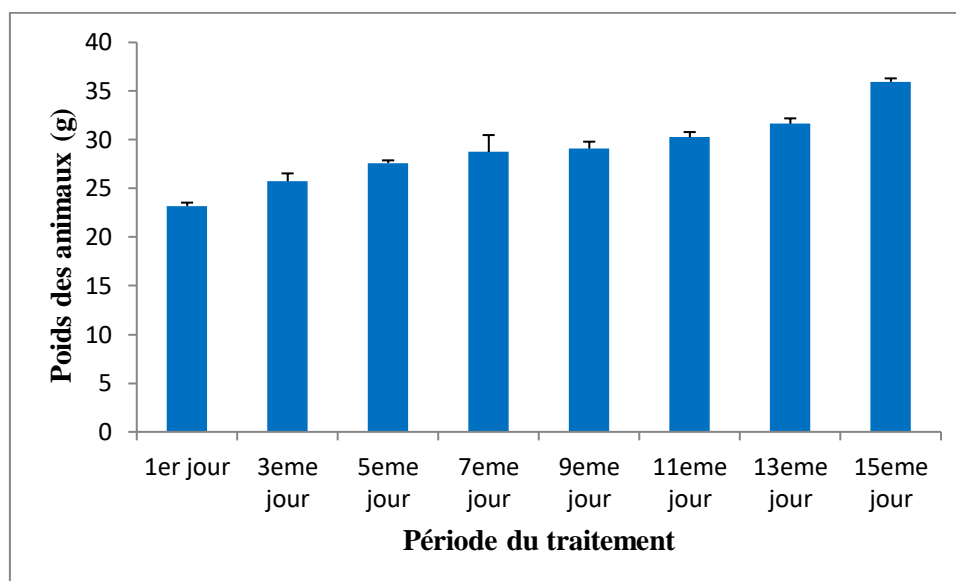
## 2- Estimation de la toxicité des extraits

L'estimation de la toxicité des extraits a été réalisée, pendant 15 jours, sur 6 lots de souris *Mus musculus*. Les 3 premiers lots, traités par la bave, ont reçus respectivement : 20, 26.6 et 33.3 ml/Kg de bave, ce qui est égale à 600, 800 et 1000 µl/souris. Tandis que les 3 lots restants, traités par l'homogénat, ont reçu quant à eux : 4, 4.5 et 5 g/Kg d'homogénat, ce qui est égal à 120, 140 et 160 mg/souris.

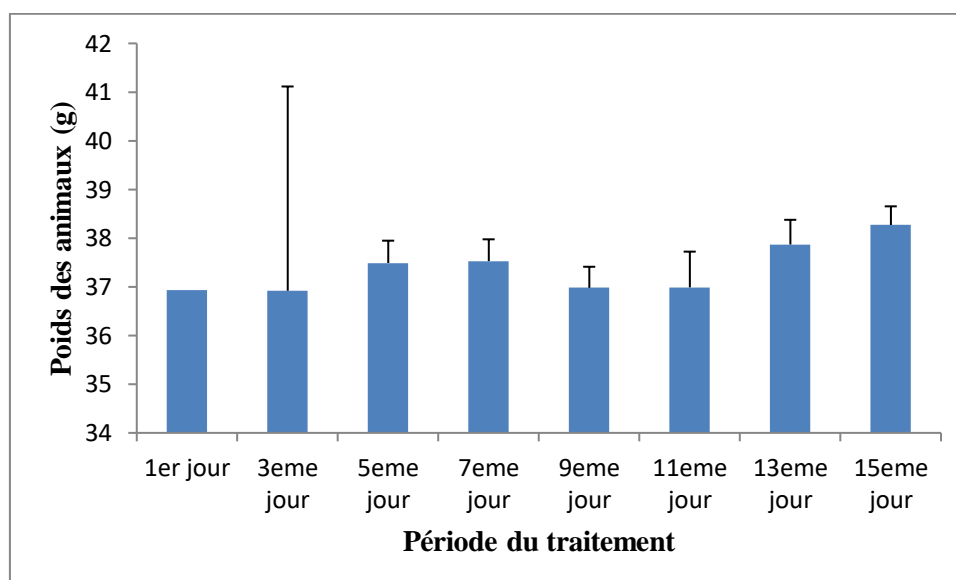
Des observations ont été établies chaque jour après gavage de 30min, 1h, 5h et 24h, ainsi que la température et le poids des souris ont été pris et cela durant 15 jours.

Aucun décès n'a été enregistré durant l'expérience. Les valeurs des poids et des températures sont illustrés par les histogrammes suivants :

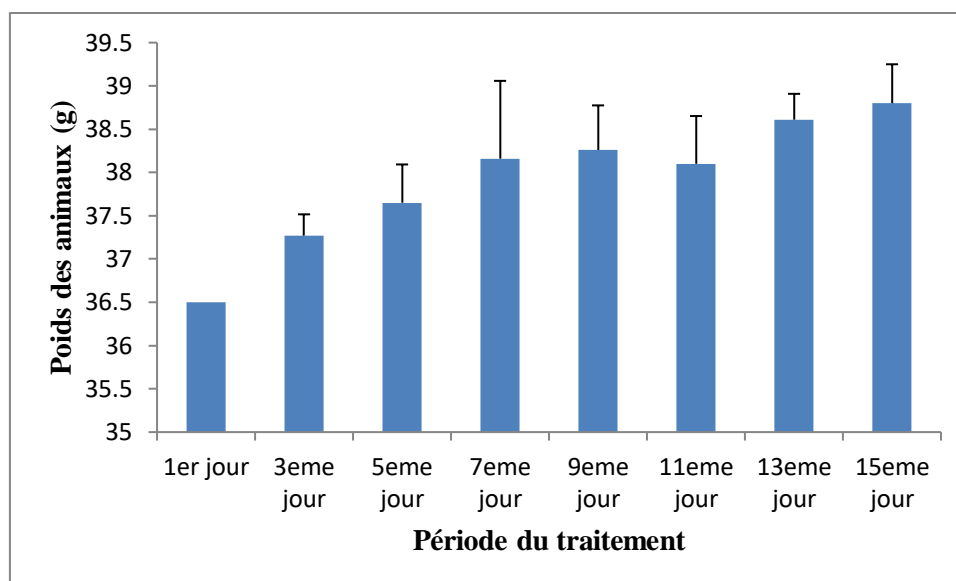
## 2.1-Poids des lots traités par la bave



**Figure 15 :** Poids des animaux traités par 600 µl de bave (dose égale à 20 ml/Kg)

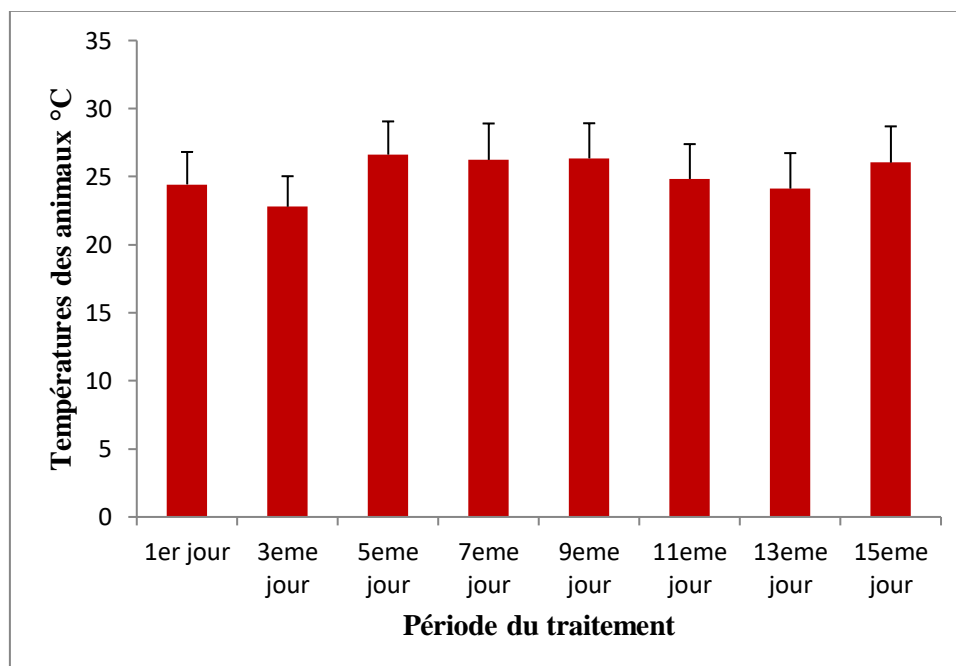


**Figure 16 :** Poids des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6 ml/Kg)

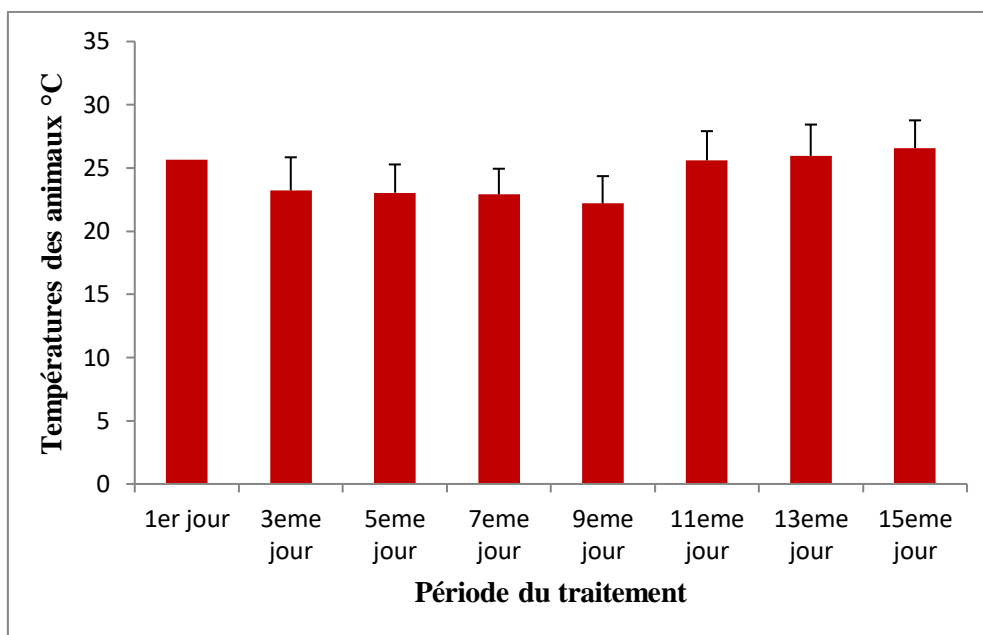


**Figure 17 :** Poids des animaux traités par 1000  $\mu$ l de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg)

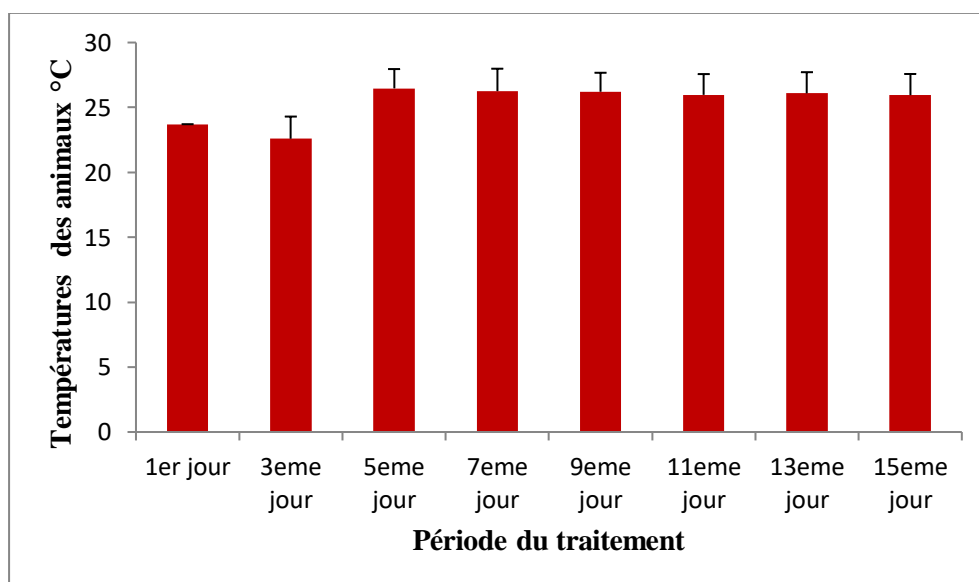
### 2.3- Températures des lots traités par la bave



**Figure 18 :** Températures des animaux traités par 600  $\mu$ l de bave (dose égale à 20 ml/Kg)

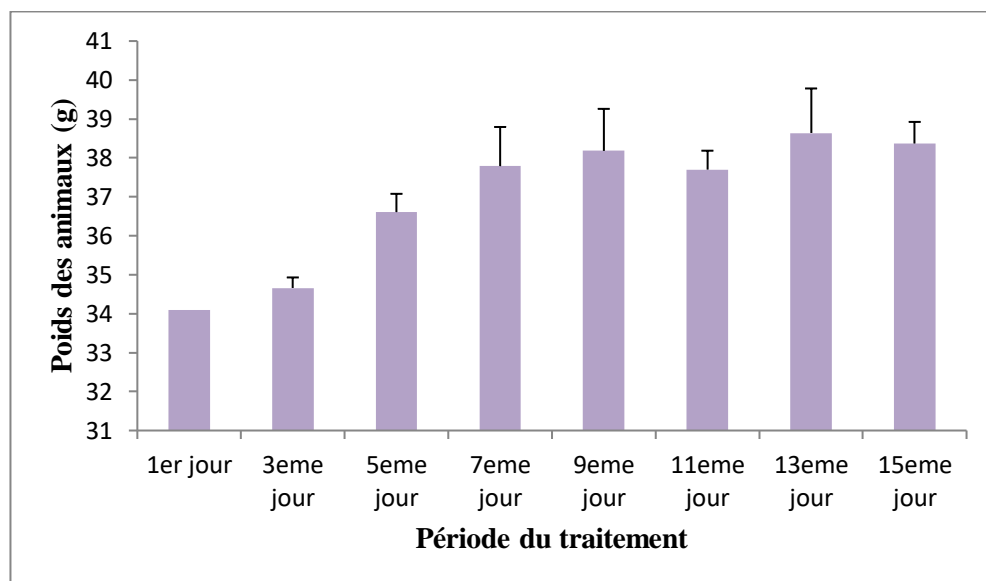


**Figure 19 :** Températures des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6 ml/Kg)

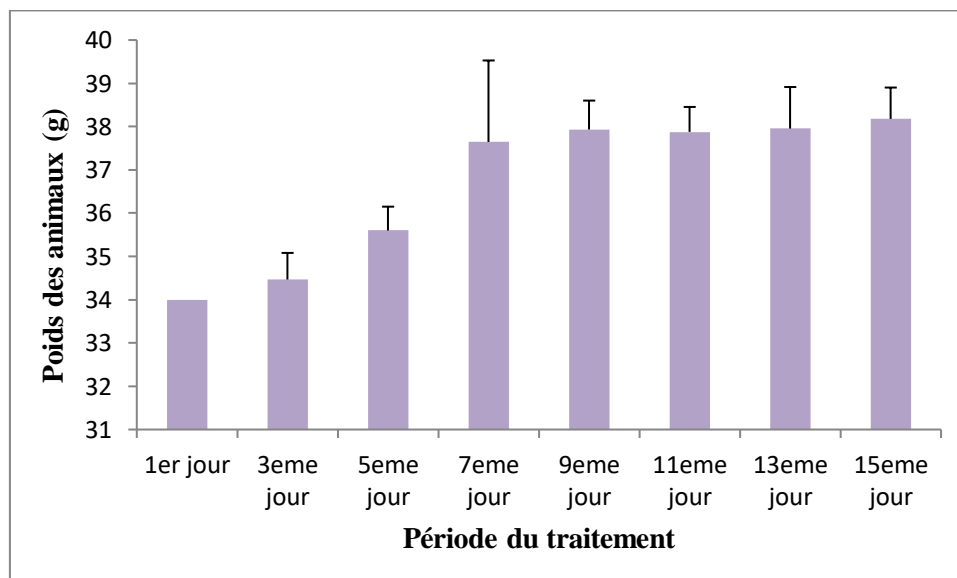


**Figure 20 :** Températures des animaux traités par 1000 µl de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg)

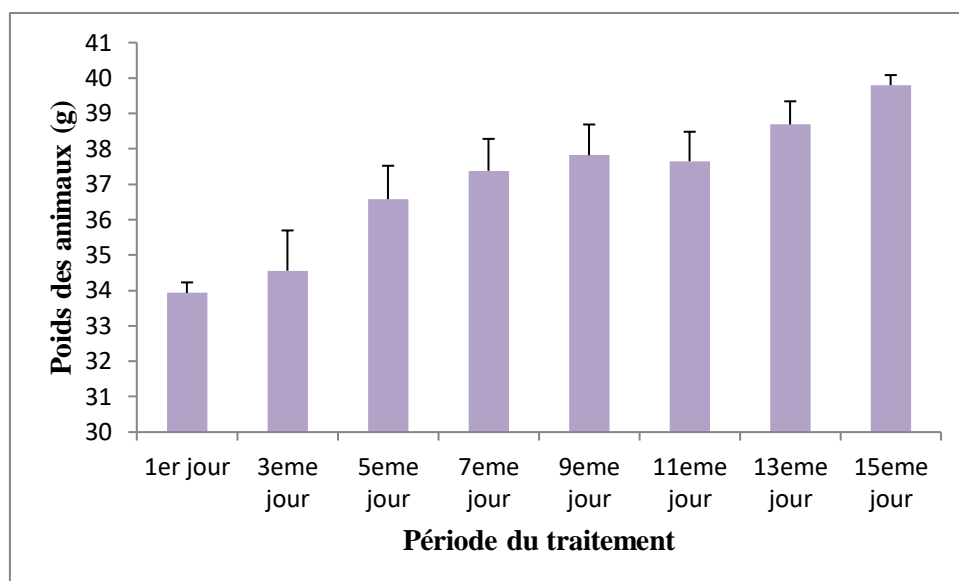
## 2.4- Poids des lots traités par l'homogénat



**Figure 22 :** Poids des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg)

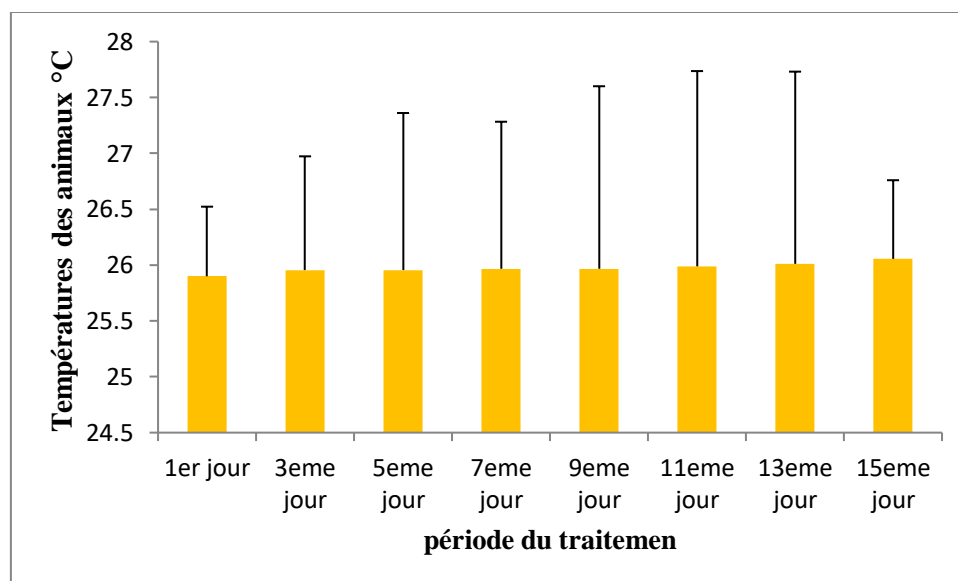


**Figure 23 :** Poids des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg)



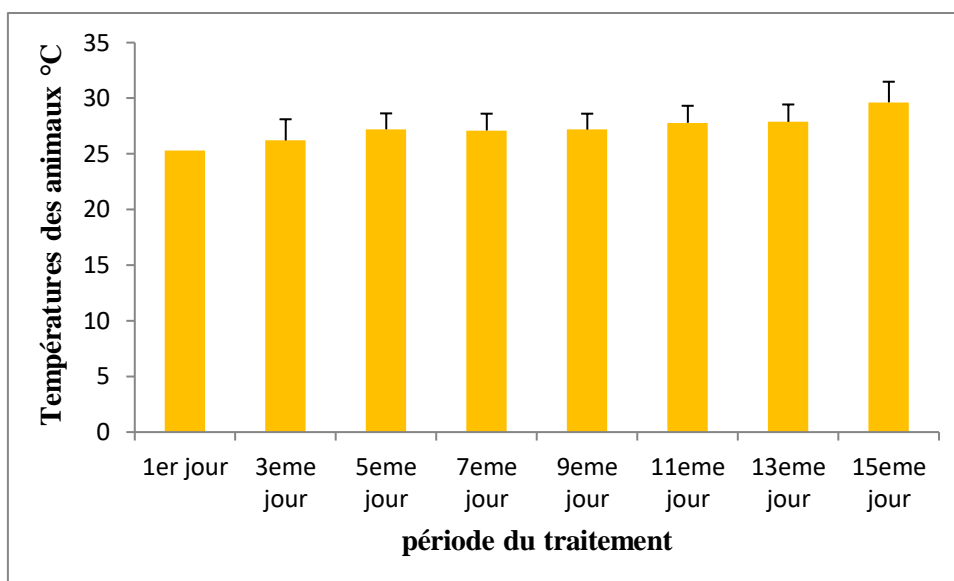
**Figure 24 :** Poids des animaux traités par 160 mg d'homogénat (dose égale à 5 g/Kg)

### 2.5- Températures des lots traités par l'homogénat

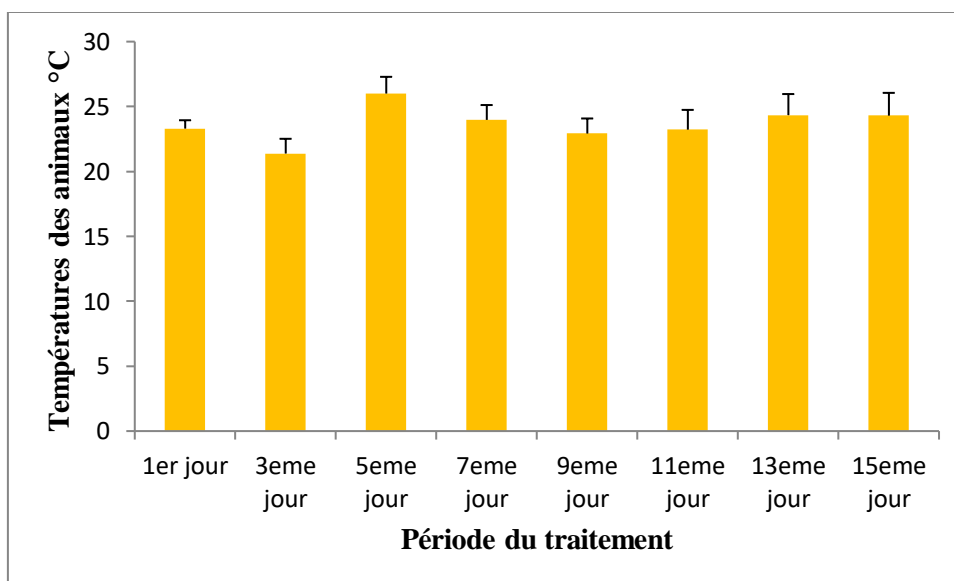


**Figure 25 :** Températures des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg)





**Figure 26 :** Températures des animaux traités par 140 mg d'homogénat  
(dose égale à 4,5 g/Kg)



**Figure 27 :** Températures des animaux traités par 160 mg d'homogénat (dose égale à 5 g/Kg)

## IV- DISCUSSION

### 1- Caractérisation des extraits

Le **tableau 3** et la **Figure 14** présentent une brève estimation de la concentration des composants biochimiques contenus dans l'extrait aqueux et donc l'homogénéat de l'escargot *Helix aspersa*. Le taux des protéines, lipides et polyphénols semble appréciable. Contrairement au fait que la composition de plusieurs nutriments a été bien connue depuis longtemps, ceux contenus dans la chair des escargots sont encore mal connus. Les escargots contiennent un faible pourcentage de lipides et un pourcentage élevé de minéraux diététiques, d'acides aminés essentiels et de bons acides gras (Gomot 1998, Toader-Williams 2011).

Le dosage des lipides contenus dans les escargots est utile. Ils peuvent fournir à titre d'exemple des acides gras qui ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain et proviennent donc par la nutrition, tels que les oméga-3. Les oméga-3 sont très bénéfiques parce qu'ils préviennent l'athérosclérose et la thrombose et ont un effet anti-inflammatoire qui intervient dans les allergies, la dépression et d'autres maladies du système nerveux.

Les acides uroniques, tout comme le magnésium, le sodium et le phosphore, peuvent former des complexes avec les molécules toxiques et permettre, de ce fait, leur élimination.

Les glucides dans l'alimentation sont une source importante d'énergie avec une gamme d'effets chimiques, physiques et physiologiques. Certains légumes présentaient une teneur élevée en polyphénols comme indiqué dans le **tableau 4**.

Le **tableau 4** donne un bref aperçu des nutriments qui ont la plus forte concentration de polyphénols dans certains aliments. Le contenu des polyphénols dans la chair de l'escargot *Helix aspersa* semble très faible comparativement à ceux des légumes, mais peut quand même avoir quelques effets thérapeutiques tels qu'un effet anti-inflammatoire.

**Tableau 4** : teneur en polyphénols dans certains légumes (Sarni-Manchado 2005)

<b>Légumes</b>	<b>Polyphénols Totaux (mg/100g)</b>
Artichaut	321.3
Persil	280.2
Choux de Bruxelles	257.1
Échalier	104.1
Brocoli	98.9

## 2- Estimation de la toxicité des extraits

Une étude de la toxicité de la bave et de l'homogénat a été établie selon un protocole pendant 15 jours sur des souris *Mus musculus*. Durant les 15 jours de l'expérimentation. Des observations ont été établies chaque jour après gavage de 30min, 1h, 5h et 24h, ainsi que la température et le poids des souris ont été pris.

Aucun signe de toxicité ou de mortalité n'a été enregistré pendant l'expérience ainsi que les poids et les températures des souris étaient plus ou moins stables pendant les quinze jours.

Avec les concentrations de 160 mg d'homogénat (5g/Kg) et 600 µl de bave (20 ml/Kg), les animaux ont montré le meilleur gain de poids et une légère diminution de température. Le comportement de tous les animaux est resté normal. Par conséquent, ces concentration (5 g / kg d'homogénat et 20 ml/Kg de bave) ont été choisies pour le reste des expériences.

**V- Conclusion**

L'escargot *Helix aspersa* est une espèce de gastéropode très répandue dans notre pays, disponible sur le marché et facile à collecter. Les extraits choisis (bave, homogénat et extrait aqueux) sont faciles à extraire et à préparer et ne demandent qu'un matériel de base, disponible dans n'importe quel laboratoire. La caractérisation de ces extraits a révélé la présence d'une fraction importante de protéines, glucides et lipides ainsi qu'une petite fraction de polyphénols.

Après avoir choisi le matériel biologique, et après la caractérisation des extraits, il a été indispensable d'estimer la toxicité de ces derniers. La bave et l'homogénat se sont avérés non toxiques, ainsi, les doses de 5 mg/Kg d'homogénat et 20 ml/Kg de bave ont été choisies pour le reste des expériences.

# **Chapitre II**

## **Effet Immunomodulateur**

## I- INTRODUCTION

L'animal supérieur évolue dans un milieu extrêmement riche en éléments qui lui sont hostiles : parasites, bactéries, virus. Pour sauvegarder son intégrité, il doit lutter en permanence contre cet environnement. L'animal est muni, à cet effet, d'un remarquable outil de défense que constitue le système immunitaire (Benzair A, 2005).

**Le système immunitaire** est un système hautement sélectif mais la manière dont il peut accomplir cette sélection reste profondément énigmatique (Male, D and al. 2006). Il implique un ensemble de mécanismes de défense très puissants pour protéger l'organisme contre les antigènes exogènes : bactéries, virus et parasites, ou endogènes tels que les cellules malignes, infectées par un virus ou auto-réactives.

Le système immunitaire se divise en deux sortes de réponses qui se manifestent en coordination: l'immunité innée (non spécifique) qui se constitue de barrières physiques, composants cellulaires, facteurs solubles et des cellules phagocytaires (Goldsby RA and al, 2000) ; et l'immunité acquise ou adaptative (spécifique) qui se constitue essentiellement des lymphocytes B, qui produisent des anticorps, exerçant ainsi une immunité à médiation humorale et des lymphocytes T, qui causent la cytotoxicité des cellules cibles et mènent donc à une immunité à médiation cellulaire. L'immunité innée non spécifique peut fournir une défense précoce de l'organisme contre les différentes infections (Borgdan C and al, 2000) avant l'installation de l'immunité adaptative qui développe une réaction spécifique à chaque antigène, en lui consacrant une mémoire cellulaire et des composants solubles bien spécifiques (Goldsby RA and al, 2000).

**Le système réticulo-endothélial**, appelé maintenant système phagocytaire mononucléé (Frenčík and al. 2005) fait partie de l'immunité innée non spécifique. Il comprend les monocytes sanguins, les macrophages tissulaires et leurs précurseurs cellulaires de la moelle osseuse. Toutes ces cellules ont des fonctions de phagocytose, de pinocytose et la capacité d'adhérer à des surfaces diverses (Frenčík and al. 2005).

**La phagocytose** est considérée comme étant le moyen principal de la défense non spécifique de l'organisme. Les cellules phagocytaires mononucléées interviennent, non seulement, dans la réponse immunitaire non spécifique mais aussi lors de la réponse immunitaire spécifique (Sorensen and al, 1997).

La phagocytose est l'un des mécanismes essentiels de l'immunité innée par lequel les phagocytes ingèrent les micro-organismes et les autres particules de diamètre supérieur à 0,1  $\mu\text{m}$ . C'est un processus complexe comportant plusieurs étapes mutuellement entremêlées (Frenčík and al. 2005). Il commence par l'ingestion de l'antigène et se termine par la modification et la décomposition chimique de ses composants structurels.

Un certain nombre de réactions chimiques peut avoir lieu pendant la phagocytose : une dégradation des biomolécules par la digestion enzymatique et des modifications chimiques (Borgdan C and al, 2000) dont le « Burst Oxydatif » ou burst respiratoire qui correspond à une brusque augmentation de la consommation en oxygène qui a pour finalité la production d'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$ , de perhydrol et l'oxydation du glucose par le shunt des hexoses monophosphates. Les cellules phagocytaires englobent l'antigène dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiales pour former le phagolysosome, à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées (Auberval, 2010). Le burst oxydatif est la première ligne de défense dans un environnement pathogène (Dröge W, 2002).

**L'immunomodulation** est la modification et la régulation de la réponse immunitaire dans des buts thérapeutiques. Une telle intervention peut avoir pour but une stimulation (immunostimulation) ou une suppression (immunosuppression) ou une normalisation de la réponse immunitaire. Il existe des médicaments susceptibles d'accroître ou de diminuer les fonctions du système immunitaire pour le ramener à un niveau normal (Frenčík and al. 2005).

Un immunomodulateur est une substance qui modifie n'importe quel constituant ou fonction du système immunitaire d'une façon spécifique ou non spécifique en influençant l'intensité de la réponse immunitaire aussi bien spécifique que non spécifique (Agarwal SS, 1999, Gulati K, 2002). Il peut induire une immunostimulation en activant des cellules effectrices ou en inhibant les facteurs limitants de l'immunité. L'immunosuppression peut être accomplie en stimulant les cellules inhibitrices et les facteurs humoraux ou en inhibant les cellules effectrices (Katiyar CK, 1997).

De nombreuses études ont montré que les plantes aussi ont un système de défense ou une immunité d'un grand potentiel. D'autres études ont prouvé que parmi les plantes médicinales, il existe celles qui –par leurs extraits- exercent un effet immunomodulateur et antitumoral (Verma SK, 2010, 2010,2011).

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'effet immunomodulateur d'un extrait d'origine animale : l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*, sur l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial.

## II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'évaluation de l'effet immunomodulateur de l'extrait aqueux a été réalisée par un test de clairance du carbone. Cette expérimentation a été effectuée sur des souris mâles adultes de la race *Mus musculus* obtenues de l'institut de pharmacie (Université de Constantine, Algérie), de poids corporel compris entre 25 et 30 g. Ces souris ont été maintenues dans des conditions d'acclimatation normales du laboratoire pendant 15 jours en ayant accès libre à l'alimentation et l'eau. Ces animaux ont servi de modèle expérimental pour évaluer l'effet immunomodulateur (immunostimulant et/ou immunosuppresseur) de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*.

Suivant la méthode de (Biozzy and al. 1953) modifiée par (Benacerraf and al. 1959, Drissi and al. 2006), la stimulation du système réticuloendothélial a été induite par l'administration de 3 doses différentes de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*, par injection intrapéritonéale. Les souris ont été divisées en 4 groupes de 6: le 1<sup>er</sup> groupe (groupe contrôle) a reçu 300 µl d'une solution NaCl 9‰, le 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> groupes ont reçu, respectivement, des doses de 50, 100 et 250 mg/Kg d'extrait aqueux.

Dans le but d'étudier l'activité granulopectique du système réticuloendothélial, les souris ont reçu, après 48h de l'administration de l'extrait aqueux, une injection intraveineuse d'une suspension de carbone (encre de chine) et de NaCl 9‰ (1v/3v) au niveau de la veine caudale.

Le sang a été prélevé à partir du plexus rétro-orbital avec un capillaire en verre, aux temps  $T_1 = 5$  min et  $T_2 = 15$  min. Le sang prélevé (14 gouttes) a été ajouté à 4ml d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) diluée à 0.1%. Cette solution permettra la lyse des érythrocytes pour pouvoir lire en suite l'absorbance du mélange à 675 nm par spectrophotométrie. Après la prise du sang, les souris ont été abattues. Le foie, la rate et le thymus ont été prélevés et pesés immédiatement.



L'activité phagocytaire des cellules réticuloendothéliales est exprimée par l'indice phagocytaire K, qui mesure la phagocytose des particules du carbone et par l'indice phagocytaire corrigé  $\alpha$  qui exprime cette activité par unité de poids des organes actifs : le foie et la rate. Le taux de clairance du carbone est exprimé par le temps de demi-vie du carbone dans le sang ( $T_{1/2}$ min)

$$K = \frac{\ln DO_1 - \ln DO_2}{t_2 - t_1}$$

$$\alpha = \sqrt[3]{K} \left( \frac{\text{Poids du corps}}{\text{Poids: foie + rate}} \right)$$

$$T_{1/2} = \frac{0.963}{K}$$

Dont : DO1 et DO2 sont les densités optiques mesurées à  $t_1$  et  $t_2$ . (Benmebarek and al. 2014)

Des frottis du sang périphériques ont été réalisés et colorés par la coloration MGG (MayGranwald/Giemsa) pour chaque souris à  $T_1 = 5$  min et  $T_2 = 15$  min pour mettre en évidence la présence et l'abondance des cellules phagocytaires dans le sang des souris, confirmant ainsi les résultats exprimés par l'indice phagocytaire K, l'indice phagocytaire corrigé  $\alpha$  et le temps de demi-vie  $t_{1/2}$ . (Adeyemo and al. 2002).

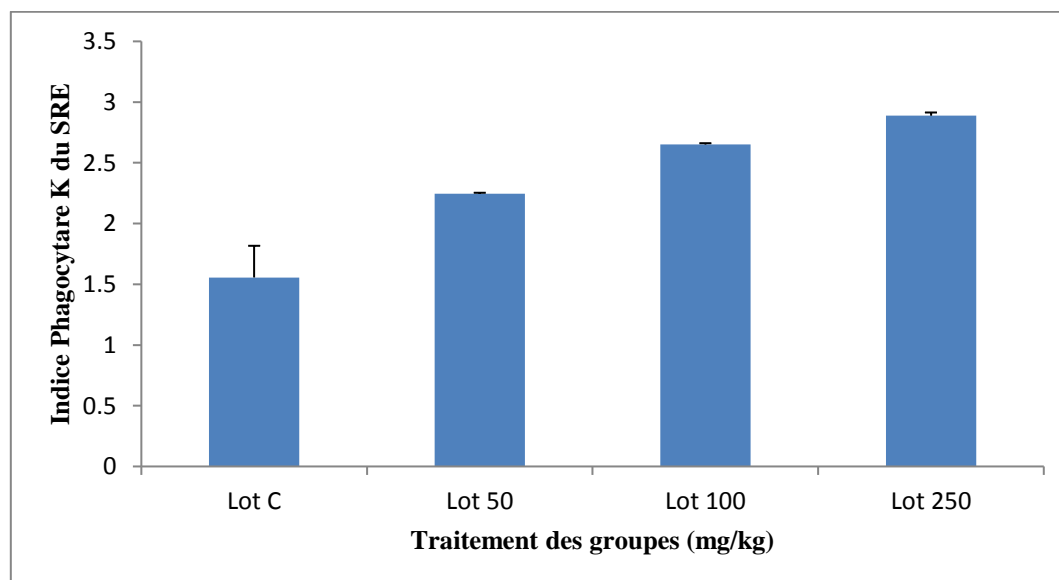
#### Analyse statistique :

L'étude statistique a été réalisée par l'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de comparaison de Dunnett's, en utilisant l'outil statistique XLSTAT 2013 pour Windows Office. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type, avec un seuil de signification statistique fixé à 5%.

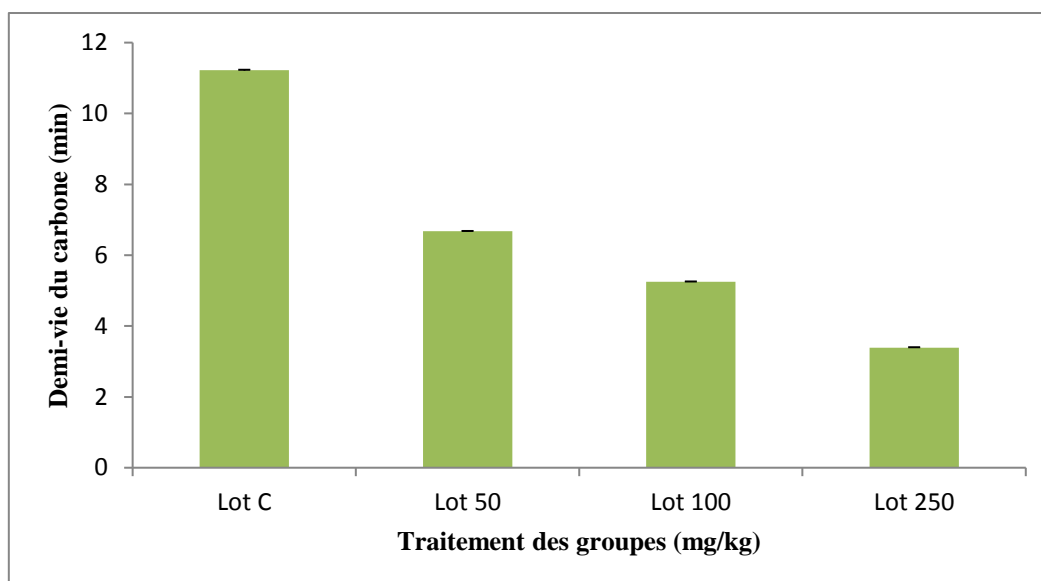
### III- RESULTATS

L'effet immunomodulateur de l'extrait aqueux de l'escargot *Helixa spersa* a été évalué *in vivo* sur des souris, par le test de clairance du carbone. Cette méthode permet d'évaluer l'action des cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial contre des particules de carbone (encre de Chine) injecté par voie intraveineuse à des souris. Cette activité exprimée par l'indice phagocytaire (K) est déterminée par la mesure des particules de carbone en circulation dans le sang, dans un intervalle de temps précis.

Les résultats montrent que les doses 50, 100 et 250mg/Kg de notre extrait, administrées respectivement, augmentent l'indice phagocytaire chez les groupes de souris traitées en comparaison avec le groupe témoin qui a reçu uniquement de l'eau physiologique (**Figure 28**). En effet, plus la dose de l'extrait administrée est élevée, plus la réponse phagocytaire augmente. Cette augmentation de l'indice phagocytaire est associée à une diminution du temps de demi-vie des particules de carbone dans le sang (**Figure 29**).

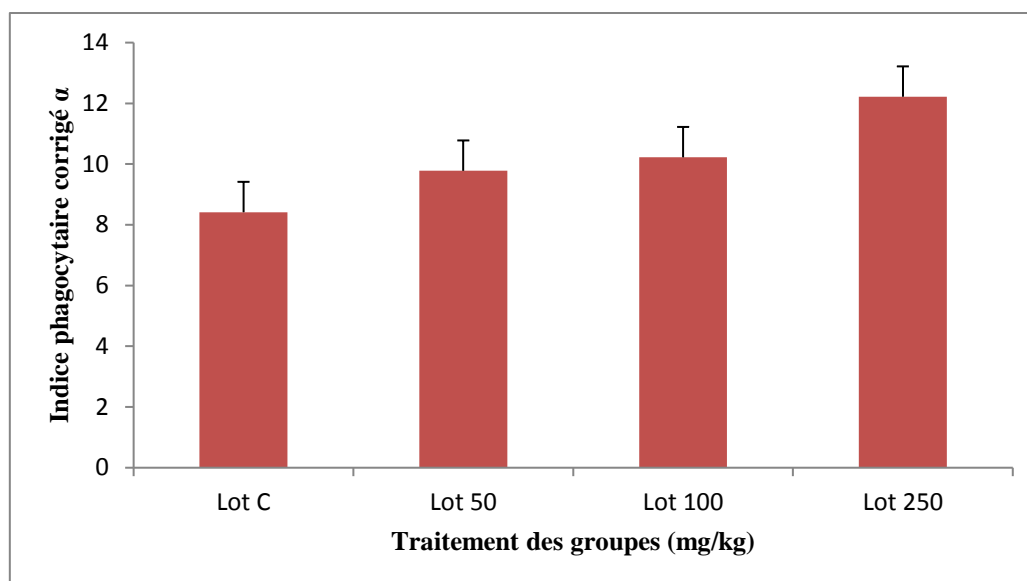


**Figure 28:** Activité phagocytaire (K) des souris traitées par l'extrait aqueux de l'escargot *Helixa spersa*



**Figure 29:** Demi-vie du carbone injecté aux souris traitées par l'extrait aqueux de l'escargot *Helix spersa*

L'activité phagocytaire corrigée exprimée par unité de poids des organes actifs (foie et rate), confirme également la stimulation de l'ensemble du système réticulo-endothélial par l'extrait aqueux de l'escargot *Helix spersa*. La **Figure 30** montre que l'indice phagocytaire corrigé est plus élevé chez les groupes traités en comparaison avec le groupe témoin. Là aussi on observe que l'indice corrigé dépend de la dose administrée (plus la dose augmente plus l'indice corrigé augmente).



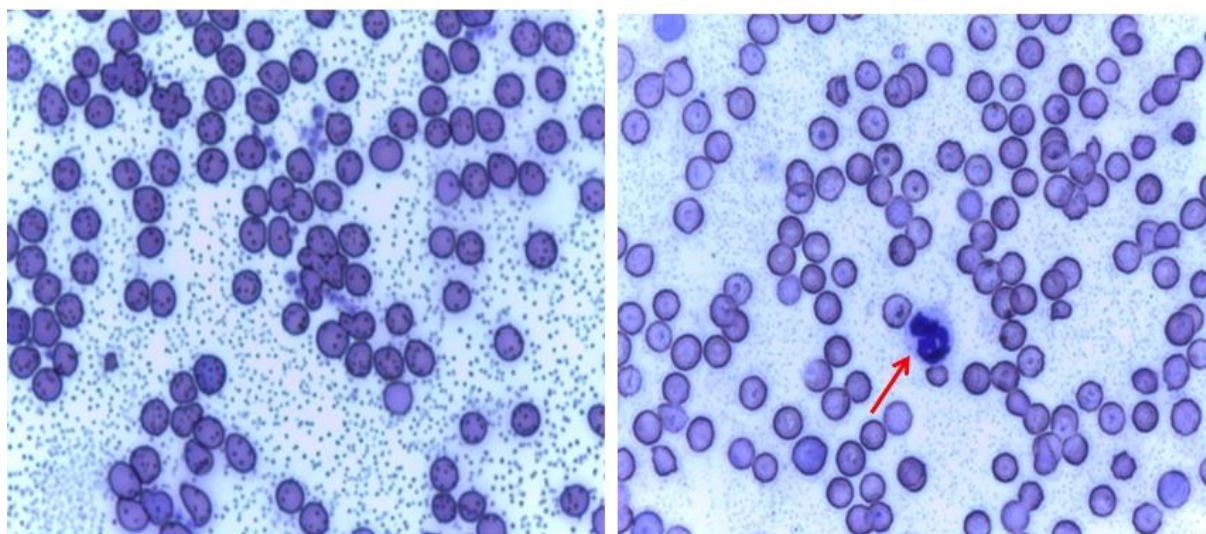
**Figure 30:** Indice phagocytaire corrigé ( $\alpha$ ) des souris traitées par l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*

Ces résultats confirment la relation entre certains organes tels que le foie et la rate (organes lymphoïdes secondaires) avec l'activité phagocytaire. L'augmentation de l'indice phagocytaire, de l'indice phagocytaire corrigé, et la diminution du temps de demi-vie des particules de carbone en circulation dans le sang, indiquent que l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa* possède un ou plusieurs facteurs capables de stimuler l'activité phagocytaire des cellules immunitaires du système réticulo-endothélial chez les souris. (Merouane F, 2016).

Des frottis du sang périphérique ont été réalisés après chaque prise de sang, pour chaque souris des différents groupes. L'observation microscopique de ces frottis a pu fournir des informations qui approuvent les résultats précédents.

Les frottis du groupe témoin (**Figures 31a et 31b**) montrent qu'après 5 min de l'injection du carbone, les particules de ce dernier demeurent abondantes dans le plasma. On remarque aussi une absence totale des cellules phagocytaires. Tandis qu'après 15 min, on remarque

que les particules de carbone sont toujours abondantes avec une présence de quelques PNN (polynucléaire neutrophiles) (flèche rouge).



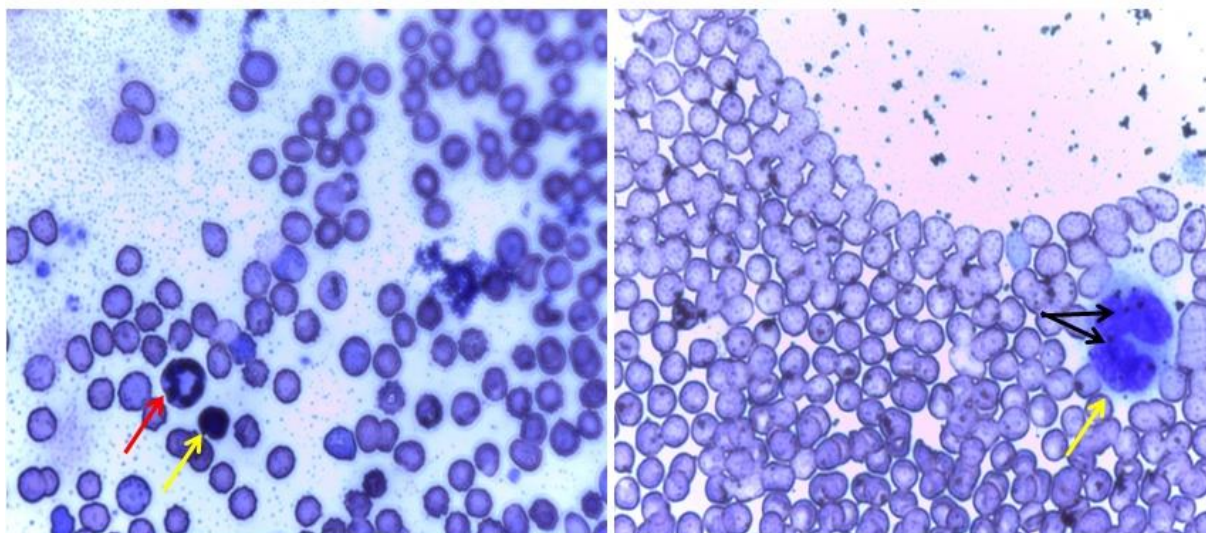
31.a - Lot C à T<sub>1</sub>

31.b - Lot C à T<sub>2</sub>

**Figure 31** : Frottis sanguins du lot Contrôle (300 µl NaCl 9‰) à T<sub>1</sub> = 5 min et T<sub>2</sub> = 15 min.

G x 40

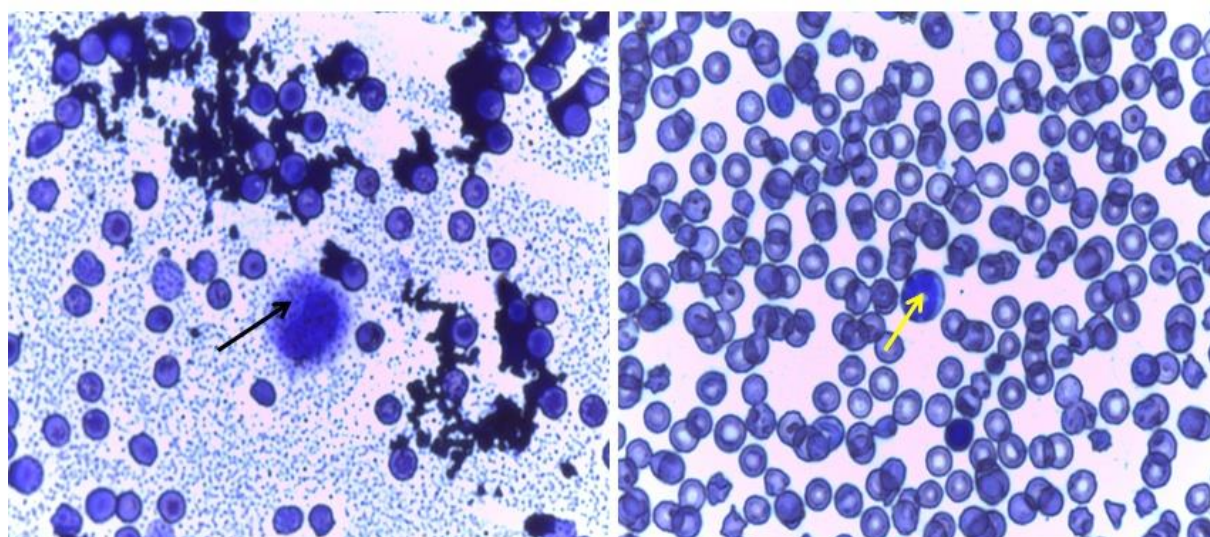
Chez les souris traitées par 50 mg/Kg d'extrait aqueux, les frottis montrent qu'à la première prise de sang (**Figure 32.a**), on remarque une abondance des particules de carbone avec une présence de quelques cellules phagocytaires (un PNN en flèche rouge et un monocyte en flèche jaune). La **Figure 32.b** qui représente le frottis réalisé à la deuxième prise, montre une diminution de la quantité des particules du carbone dans le plasma. Elle présente aussi un monocyte (en flèche jaune) qui a commencé à engloutir les particules de carbones (flèches noires).

32.a - Lot 50 à T<sub>1</sub>32.b - Lot 50 à T<sub>2</sub>

**Figure 32 :** Frottis sanguins du lot traité par 50 mg/Kg d'extrait à T<sub>1</sub> = 5 min et T<sub>2</sub> = 15 min.

G x 40

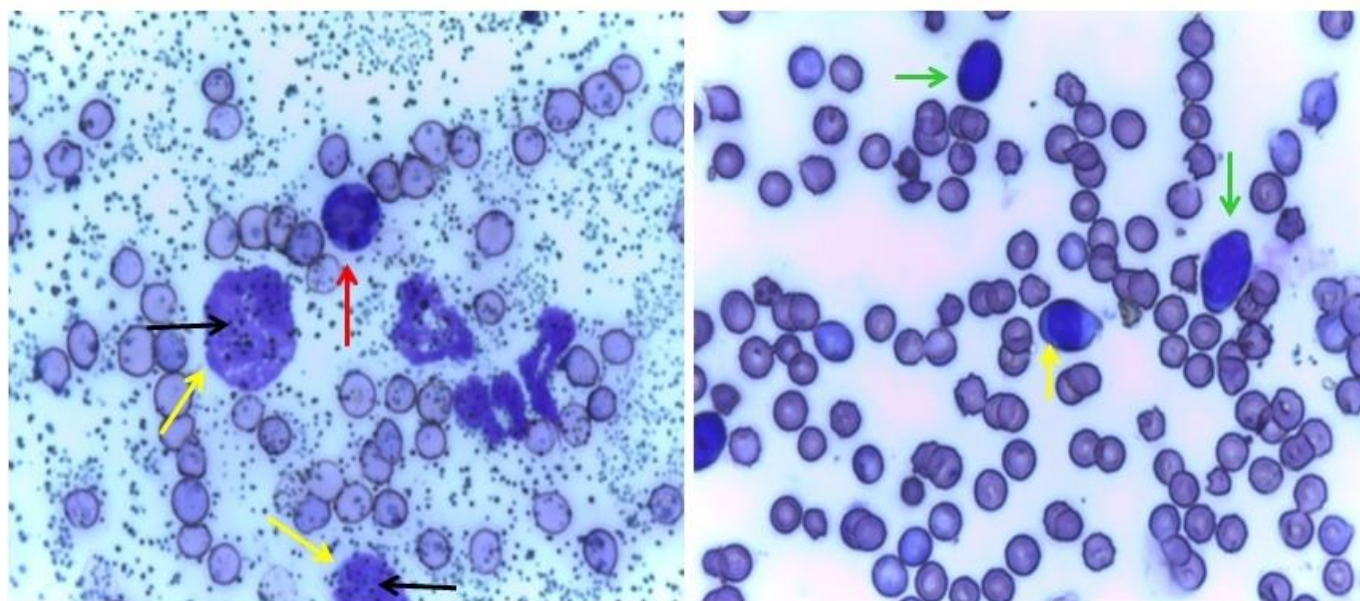
La **Figure 33** présente les frottis réalisés à partir du sang des souris traitées par la dose 100 mg/Kg. À T<sub>1</sub> = 5 min, on remarque toujours une abondance des particules de carbone dans le plasma et la présence de quelques monocytes qui commencent immédiatement à phagocyter le carbone (flèche noire) (**Figure 33.a**). À T<sub>2</sub> = 15 min, il y a une absence totale du carbone au niveau du plasma et même au niveau des monocytes (**Figure 33.b**).

33.a - Lot 100 à T<sub>1</sub>33.b - Lot 100 à T<sub>2</sub>

**Figure 33 :** Frottis sanguins du lot traité par 100 mg/Kg d'extrait à T<sub>1</sub> = 5 min et T<sub>2</sub> = 15 min.

G x 40

Pour le dernier groupe (250 mg/Kg), le frottis de la première prise de sang (**Figure 34.a**) montre une abondance aussi bien du carbone que de cellules phagocytaires, telles que les neutrophiles (en flèche rouge) et les monocytes (en flèches jaunes) qui sont en pleine phagocytose des particules du carbone (flèches noires). La **Figure 34.b** montre qu'à la deuxième prise de sang, les particules de carbones ont totalement disparu. On observe aussi la persistance des monocytes (flèche jaune) mais aussi la présence d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes (flèches vertes).



**34.a** - Lot 250 à T<sub>1</sub>

**34.b** - Lot 250 à T<sub>2</sub>

**Figure 34** : Frottis sanguins du lot traité par 250 mg/Kg d'extrait à T<sub>1</sub> = 5 min et T<sub>2</sub> = 15 min.

#### IV- DISCUSSION

Dans notre travail, nous avons essayé d'étudier et de mettre en évidence l'effet immunomodulateur de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix spersa*. Cette étude a été réalisée grâce au test de la clairance du carbone colloïdal (encre de chine) dans le sang des souris. Chez les animaux de laboratoire, le test de clairance du carbone, permet de déterminer l'influence des immunomodulateurs sur les changements de l'activité phagocytaire initiée par le système réticulo-endothélial. Ce système se compose de la rate (sinus spléniques), thymus, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, le foie (cellules de Kppffer),

les glandes surrénales, et l'hypophyse (Liu *et al.* 2010; Erukainure *et al.* 2011) ainsi que les différentes cellules immunitaires.

La phagocytose est principalement réalisée par des phagocytes dits « professionnels », ce qualificatif vient de leur taux de phagocytose nettement plus élevé, ainsi que de l'adaptation de leur machinerie moléculaire interne d'ingestion. Chez les organismes supérieurs, il existe deux types de phagocytes professionnels : les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) comme les neutrophiles et les éosinophiles et les phagocytes mononucléaires (monocytes et macrophages). Les phagocytes mononucléaires jouent un rôle important dans l'immunomodulation. Plusieurs études suggèrent que la cible primaire de la plupart des immunomodulateurs est : les macrophages (dans les tissus) ou les monocytes (au niveau du sang). Ces cellules initient une réponse immunitaire innée, qui à son tour, orchestre la réponse adaptative (Singhal M and Ratra P, 2013).

L'augmentation de l'indice phagocytaire K (**Figure 29**) et l'indice phagocytaire corrigé  $\alpha$  (**Figure 30**) ainsi que la diminution des particules de carbone dans le sang  $T_{1/2}$  (**Figure 29**), reflètent l'amélioration de la fonction phagocytaire et l'immunité non spécifique. Lorsque la suspension de carbone (encre de Chine) est injectée par voie intraveineuse, le taux d'élimination du carbone dans le sang est régi par une équation exponentielle (Biozzi *et al.*, 1953).

L'amélioration de l'activité phagocytaire a été confirmée par l'observation microscopique des frottis sanguins réalisés à partir de la première et de la deuxième prise de sang ( $T_1=5\text{min}$  et  $T_2=15\text{min}$ ). Les frottis du lot contrôle, qui a reçu uniquement de l'eau physiologique, montrent le commencement la réponse immunitaire non spécifique. Les particules de carbones sont très abondantes et il n'y a pas de cellules immunitaires (**Figure 31.a**). Ce n'est qu'après 15 min de l'injection du carbone qu'on remarque la présence des neutrophiles (**Figure 31.b**).

Dans des conditions normales (non expérimentales), les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules recrutées au site de l'inflammation au de l'infection. La persistance su stimulus conduit au recrutement des monocytes circulants (Bastide JM *et al.*, 1990), c'est ce qu'on observe après l'administration de la dose 50 mg/Kg d'extrait aqueux. On constate après 5 min (**Figure 32.a**), l'abondance des particules de carbones au niveau du plasma t la présence des neutrophiles et des monocytes. Après 15 min (**Figure 32.b**), les particules de carbone deviennent moins abondantes et on peut observer clairement



un monocyte entrain de phagocyter les particules du carbone, ce résultat est similaire à ceux retrouvés par (Adeyemo OK et al, 2002).

L'amélioration de l'activité phagocytaire par l'injection d'une dose plus élevée de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa* (100 mg/Kg), est nettement visible au niveau des frottis. Pour la première prise de sang (**Figure 33.a**), les particules de carbones sont très nombreuses au niveau du plasma mais on observe le recrutement direct des monocytes qui commencent immédiatement à phagocyter le carbone. L'amélioration de l'activité phagocytaire est confirmée par la disparition totale des particules de carbone au niveau du plasma après 15 min (**Figure 33.b**). Cette observation confirme que la phagocytose a été plus efficace et plus rapide.

L'activité phagocytaire pourrait être meilleure. Pour le prouver, on a injecté une dose encore plus élevée de notre extrait (205 mg/Kg). On observe après 5 min, la présence de plusieurs neutrophiles et de plusieurs monocytes avec un plasma riche en carbone (**Figure 34.a**). L'augmentation du nombre de cellules phagocytaires ne dépend pas d'une multiplication in situ, mais d'un afflux plus important (Bastide JM et al, 1990). Après 15 min de l'injection du carbone, on remarque la disparition de toutes les particules au niveau du plasma en présence des neutrophiles et monocytes recrutés après 5 min, renforcés par des lymphocytes (**Figures 34.b**). A partir de cette dose, la réponse immunitaire non spécifique effectuée par les cellules phagocytaires fait appel à d'autres cellules plus efficaces appartenant à la réponse spécifique. Ce sont les cellules dites « effectrices » qui consistent en les lymphocytes T (Th) qui vont à leur tour activer les lymphocytes B pour se différencier en LB mémoires et plasmocytes. De ce fait, l'efficacité des cellules phagocytaires à éliminer les particules inertes est nettement renforcée par l'opsonisation de ces particules grâceaux anticorps (secrétés par les plasmocytes) et au complément (par son fragment opsonisant le C3b), conduisant à une élimination beaucoup plus rapide des particules qui circulent dans le sang (Nudo and Catap, 2011; Sidiqet *al.*, 2011; Benmebareket *al.*, 2013).

## V- CONCLUSION

Après toutes ces observations, on peut conclure que l'effet immunomodulateur de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*, s'avère « immunostimulant ». L'immunostimulation du système immunitaire induite par l'administration de notre extrait est « dose dépendante » : plus la dose est élevée, plus l'activité phagocytaire est meilleure et plus efficace.

Cette propriété immunostimulante de l'escargot *Helixa spersa* ouvre plusieurs horizons, elle nous insite à planifier l'investigation et la recherche d'autres effets thérapeutiques de cet escargot. Par conséquent, l'étude des effets : anti-inflammatoire et Anti-oxydant est envisagée.

# **Chapitre III**

## **Effet Anti-Inflammatoire**

## I- INTRODUCTION

La réaction inflammatoire est une réponse tissulaire, généralement locale, à une agression provoquée par un agent biologique, chimique ou physique. Elle constitue un mécanisme clé dans la défense non spécifique envers les agents pathogènes et tend à limiter l'invasion tissulaire en détruisant les germes avant l'installation d'une réponse immunitaire spécifique (Bastide et al, 1990).

L'inflammation aiguë est une réponse immédiate, de courte durée (quelque jour), caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Ce type d'inflammation guérit spontanément ou avec une thérapeutique.

Par contre, l'inflammation chronique est une réaction qui n'a pas, généralement, aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. L'inflammation évolue souvent vers une chronicité selon l'agressivité du pathogène, le siège de l'inflammation ou la présence des anomalies de régulations du processus inflammatoire. (El Ouar, 2014)

Dans cette partie et après confirmation de l'effet immunostimulant de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*, nous nous intéressons aux effets anti-inflammatoire et anti-oxydant des extraits de cet escargot. Afin d'étudier ces deux effets, on a eu recours à l'induction d'une inflammation colorectale expérimentale aiguë, avec un agent chimique couramment utilisé : l'acide acétique.

## II- MATERIELS ET METHODES

L'induction d'une inflammation colorectale expérimentale aiguë a été réalisée selon le protocole de (Shalaby et Shatta, 2013). 60 rats *Wistar* mâles, sains, pesant entre 150 et 200 g, ont été utilisés dans cette étude. Ces rats ont reçu un traitement de NaCl 9 ‰, 5-ASA (acide 5-aminosalicylique, anti-inflammatoire commercialisé qui agit contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) ainsi que deux extraits de l'escargot *Helix aspersa* : l'homogénat et la bave.

Pour cette expérimentation, les 60 rats ont été divisés en 10 groupes (6 animaux/groupe) : 5 groupes pour l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'homogénat et 5 autres pour l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire de la bave.

**1- Effet anti-inflammatoire de l'homogénat :**

- **Groupe C (contrôle):** le groupe témoin a reçu 1 ml/Kg/j de NaCl 9 ‰ par voie orale pendant 7 jours. Au 8<sup>ème</sup> jour, le chlorure de sodium (1 ml d'NaCl 9 ‰) a été administré par voie rectale. Les rats de ce groupe ont reçu 1ml/Kg/J de NaCl 9 ‰ par gavage pendant la semaine d'après.
  
- **Groupe AA (acide acétique) :** ce groupe a reçu 1 ml/Kg/J d'NaCl 9 ‰ par voie orale pendant 7 jours. Au 8<sup>ème</sup> jour, une administration transrectale de 1 ml d'acide acétique dilué à 4%, suivie d'une administration transrectale de 2 ml de solution tampon phosphate à pH 7,2. Les rats de ce groupe ont reçu 1ml/Kg/J de NaCl 9 ‰ par gavage pendant la semaine d'après.
  
- **Groupe ASA / AA (5-ASA/acide acétique) :** ce lot a reçu 100 mg/Kg/J de 5-ASA (acide 5-aminosalicylique) pendant 7 jours et au 8<sup>ème</sup>, une administration transrectale de 1 ml d'acide acétique dilué à 4% suivi de 2 ml de tampon phosphate à pH 7,2. Après le 8<sup>ème</sup> jour, les rats ont reçu 100 mg/Kg/J de 5-ASA par gavage pendant la semaine d'après.
  
- **Groupe HMG (homogénat) :** les animaux ont reçu par voie orale 5m/Kg/J d'homogénat pendant 7 jours et au 8<sup>ème</sup>, une administration transrectale de 1 ml de NaCl 9 ‰. les rats ont reçu 5 mg/Kg/J d'homogénat par gavage pendant la semaine d'après.
  
- **Groupe HMG / AA (homogénat/acide acétique) :** les rats de ce groupe ont reçu 5 mg/Kg/j d'homogénat pendant 7 jours et au 8<sup>ème</sup>, une administration transrectal de 1 ml d'acide acétique dilué à 4%, suivie de 2 ml de tampon phosphate à pH 7,2. Après le 8<sup>ème</sup> jour, les rats ont reçu 5 mg/Kg/j d'homogénat par gavage pendant la semaine d'après.

Cette expérimentation est récapitulée dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : évaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'homogénat de l'escargot*Helix aspersa*

Lot Contrôle	Lot AA	Lot ASA/AA	Lot HMG	Lot HMG/AA
1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours	1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours	100 mg/Kg/J de 5-ASA par gavage pendant 7 jours	5 mg/Kg/J d'homogénat par gavage pendant 7 jours	5 mg/Kg/J d'homogénat par gavage pendant 7 jours
1 ml de NaCl 9‰ par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml d'AA puis 2 ml de PBS par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml d'AA puis 2 ml de PBS par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml de NaCl 9‰ par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml d'AA puis 2 ml de PBS par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour
1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours après	1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours après	100 mg/Kg/J de 5-ASA par gavage pendant 7 jours après	5 mg/Kg/J d'homogénat par gavage pendant 7 jours après	5 mg/Kg/J d'homogénat par gavage pendant 7 jours après

**2- Effet anti-inflammatoire de la bave :**

- **Groupe C (contrôle):** le groupe témoin a reçu 1 ml/Kg/J de NaCl 9 ‰ par voie orale pendant 7 jours. Au 8<sup>ème</sup> jour, le chlorure de sodium (1 ml d'NaCl 9 ‰) a été administré par voie rectale. Les rats de ce groupe ont reçu 1ml/Kg/J de NaCl 9 ‰ par gavage pendant la semaine d'après.
- **Groupe AA (acide acétique) :** ce groupe a reçu 1 ml/Kg/J de NaCl 9 ‰ par voie orale pendant 7 jours. Au 8<sup>ème</sup> jour, une administration transrectale de 1 ml d'acide acétique dilué à 4%, suivie d'une administration transrectale de 2 ml de solution tampon phosphate à pH 7,2. Les rats de ce groupe ont reçu 1ml/Kg/J de NaCl 9 ‰ par gavage pendant la semaine d'après.
- **Groupe ASA / AA (5-ASA/acide acétique) :** ce lot a reçu 100 mg/Kg/J de 5-ASA (acide 5-aminosalicylique) pendant 7 jours et au 8<sup>ème</sup>, une administration transrectale de 1 ml d'acide acétique dilué à 4% suivi de 2 ml de tampon phosphate à pH 7,2. Après le 8<sup>ème</sup> jour, les rats ont reçu 100 mg/Kg/J de 5-ASA par gavage pendant la semaine d'après.

- **Groupe Bave:** les animaux ont reçu par voie orale 20 ml/Kg/J de bave pendant 7 jours et au 8<sup>ème</sup>, une administration transrectale de 1 ml de NaCl 9 ‰. les rats ont reçu 20 ml/Kg/J de bave par gavage pendant la semaine d'après.
- **Groupe Bave / AA (bave/acide acétique) :** les rats de ce groupe ont reçu 20 ml/Kg/J de bave pendant 7 jours et au 8<sup>ème</sup>, une administration transrectal de 1 ml d'acide acétique dilué à 4%, suivie de 2 ml de tampon phosphate à pH 7,2. Après le 8<sup>ème</sup> jour, les rats ont reçu 20 ml/Kg/j d'homogénat par gavage pendant la semaine d'après.

Cette expérimentation est récapitulée dans le tableau suivant :

**Tableau 6 :** évaluation de l'effet anti-inflammatoire de la bave de l'escargot

*Helix aspersa*

Lot Contrôle	Lot AA	Lot ASA/AA	Lot Bave	Lot Bave/AA
1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours	1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours	100 mg/Kg/J de 5-ASA par gavage pendant 7 jours	20 ml/Kg/J de bave par gavage pendant 7 jours	20 ml/Kg/J de bave par gavage pendant 7 jours
1 ml de NaCl 9‰ par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml d'AA puis 2 ml de PBS par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml d'AA puis 2 ml de PBS par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml de NaCl 9‰ par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour	1 ml d'AA puis 2 ml de PBS par injection rectale le 8 <sup>ème</sup> jour
1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours après	1 ml de NaCl 9‰ par gavage pendant 7 jours après	100 mg/Kg/J de 5-ASA par gavage pendant 7 jours après	20 ml/Kg/J de bave par gavage pendant 7 jours après	20 ml/Kg/J de bave par gavage pendant 7 jours après

Après 15 jours d'expérience, tous les animaux ont été anesthésiés avec du chloroforme pendant 2 minutes avant le prélèvement d'échantillons sanguins. Un capillaire en verre a été inséré dans le sinus caverneux de l'animal et le sang obtenu a été directement collectées dans des tubes pour l'analyse des différents paramètres biochimiques tels que : l'aspartat aminotransférase (AST), l'alanine aminotransférase (ALT), la gamma glutamyltransférase (GGT), le taux de malondialdéhyde (MDA) et les protéines C réactive (CRP). Les enzymes ont été mesurées par des kits de réactions de spin commercial. Les taux de malondialdéhyde MDA ont été mesurés en fractions cytosoliques à partir de 1 g de foie congelé selon la méthode de (Iqbal et al, 2003). Les taux sériques de CRP ont été mesurés par une méthode Immunoturbidimétrique en utilisant un kit Randox commercial (UK) avec des étalons fournis par la même firme.

Ensuite, tous les animaux ont été anesthésiés par inhalation de chloroforme et immédiatement disséqués pour le prélèvement du côlon puis sacrifiés par un surdosage de chloroforme. Le colon a été lavé 3 fois avec du PBS. 10 cm du côlon distal ont été recueillis et examinés macroscopiquement. Puis il a été coupé, fixé dans du Formol dilué à 10% et incorporé dans la paraffine, teinté par la technique de routine avec l'hématoxyline-éosine pour l'observation microscopique en utilisant un microscope optique (OPTECH).

### Analyse statistique

Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$ SEM. Les résultats ont été analysés par ANOVA à un facteur suivi d'un essai de LSD Fisher (Sharon et Stenson, 1985). Une valeur de  $p < 0.5$  a été considérée statistiquement significative.

## III- RESULTATS

Aucun signe de toxicité ou de mortalité n'a été enregistré. Les poids et les températures des souris étaient stables pendant les 15 jours de l'expérimentation.

D'après l'évaluation de la toxicité, les deux extraits utilisés (homogénat et bave) s'avèrent non toxiques, ce qui signifie que la variation des valeurs des paramètres biochimiques est liée à la colite chimio-induite.

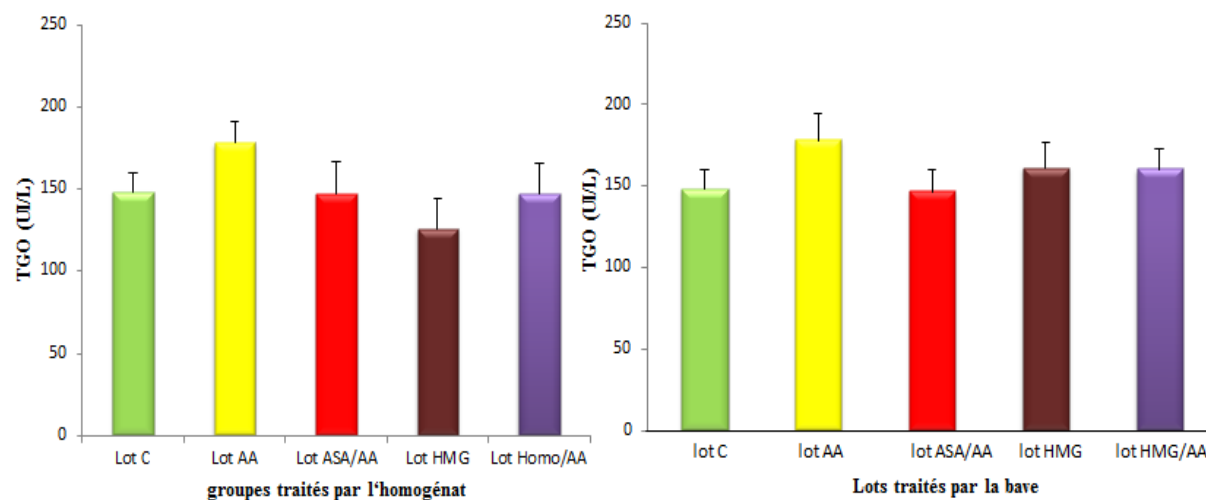
### 1- Résultats biochimiques

La colite chimio-induite obtenue dans ce travail a montré des changements dans différents paramètres biochimiques. Les paramètres pris en considération sont les enzymes : TGO (Glutamate-Oxaloacetate-Transaminase) pour évaluer l'état cardiovasculaire de l'animal, TGP (Glutamate-Pyruvate-Transaminase) qui est un marqueur sensible et spécifique d'une atteinte hépatocellulaire et  $\gamma$ GT (Gamma Glutamyl Transpeptidase) pour évaluer la fonction du foie de l'animal. Le taux de la protéine C réactive (CRP) a été mesuré pour l'évaluation du statut inflammatoire ainsi que celui des protéines totales plasmatiques, hépatiques et le Malondialdéhyde (MDA), pour l'évaluation du statut oxydant (**Tableaux 25 et 26 - Annexe 5**).

Les résultats de la **Figure 35** montrent qu'au niveau des lots traités par l'homogénat, on remarque une augmentation significative de l'enzyme TGO pour le lot **AA** par rapport au lot **C** ainsi qu'une diminution significative pour les lots **ASA/AA**, **HMG** et **HMG/AA**. Tandis que pour les lots traités par la bave, on remarque que le lot **AA** représente une

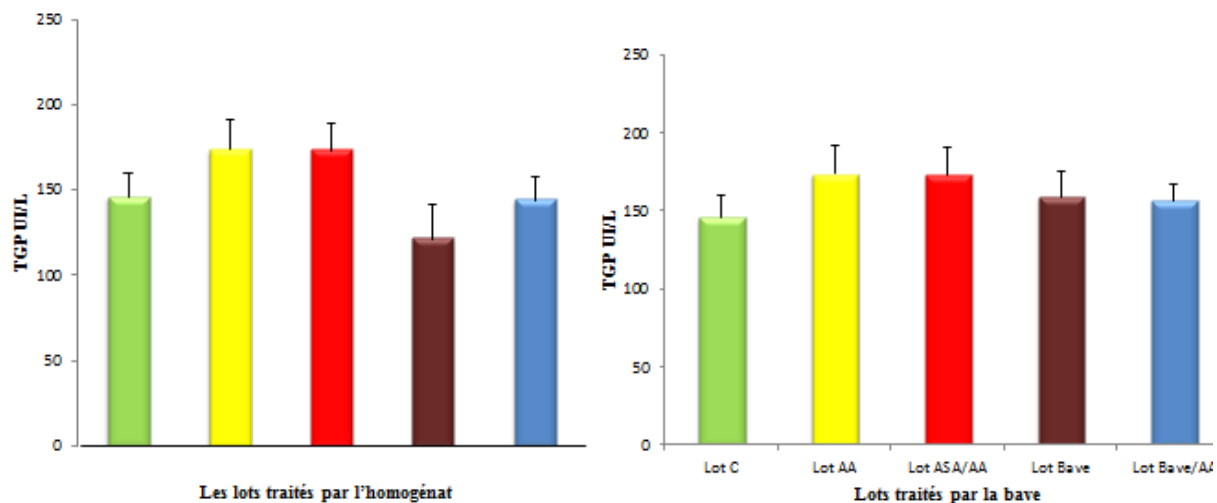


augmentation non-significative de cette enzyme. Les lots **Bave**, **Bave/AA** et **C** montrent une augmentation contrairement au lot **ASA/AA**.



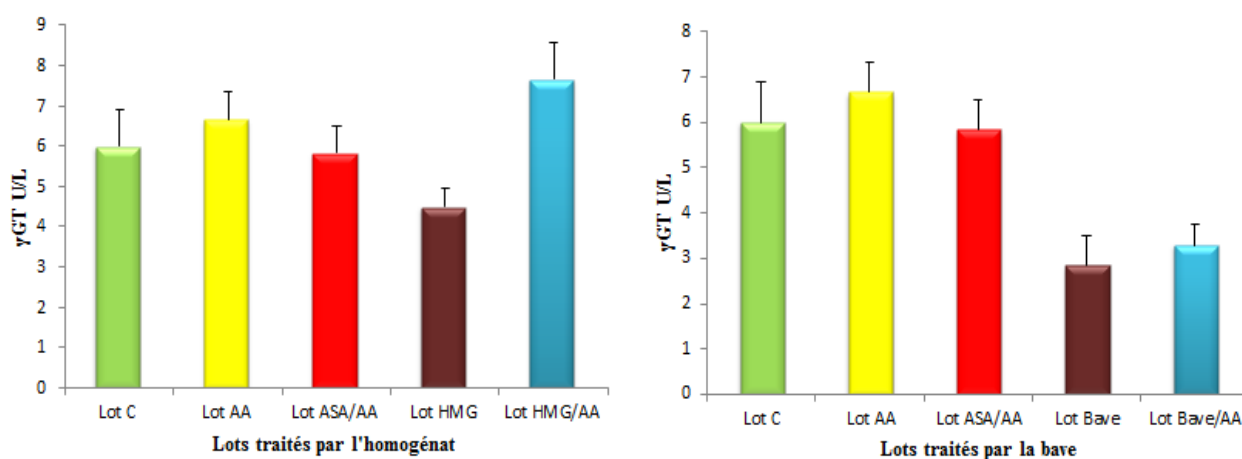
**Figure 35:** taux de la Glutamate-Oxaloacetate-Transaminase (TGO)

Pour le dosage de la TGP, La **Figure 36** montre que pour les lots traités par l'homogénéat, on remarque une augmentation significative du taux de l'enzyme dans le lot **AA** et le lot **ASA/AA** par rapport au lot **C**. Il y a aussi une diminution significative pour les deux lots **HMG** et **HMG/AA**. Cette figure présente aussi les taux de la TGP des groupes traités par la bave où on remarque que le lot **AA** représente une augmentation non-significative de cette enzyme. Les lots **ASA/AA**, **Bave**, **Bave/AA** montrent une augmentation contrairement au lot **C**.



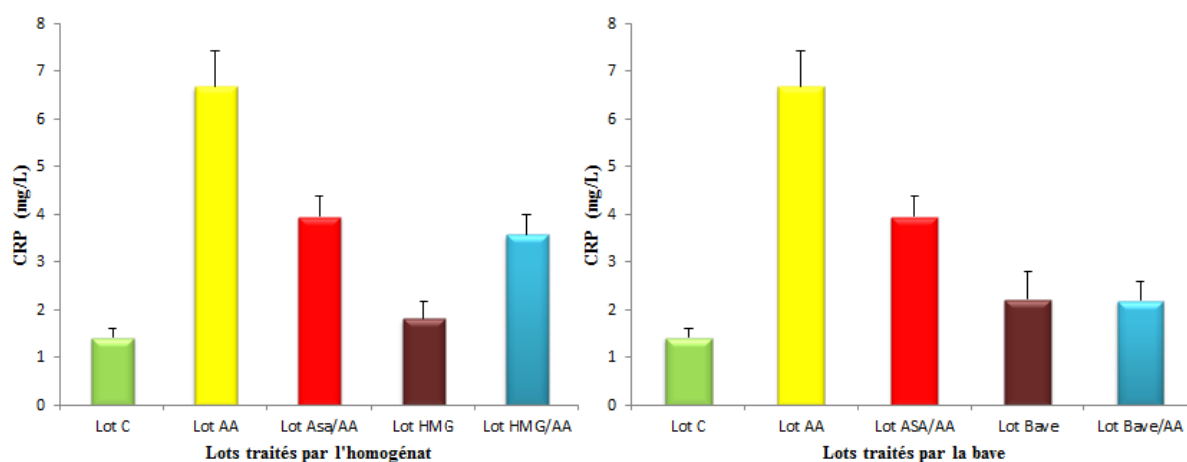
**Figure 36:** taux de la Glutamate-Pyruvate-Transaminase (TGP)

Après l'évaluation du taux de la  $\gamma$ GT, on remarque qu'au niveau des groupes traités par l'homogénéat, il y a une augmentation significative pour les lots **AA** et **HMG/AA** par rapport au lot **C**. On observe aussi une diminution significative dans le lot **ASA/AA** et une diminution non significative dans le lot **HMG**. Les groupes traités par la bave, quant à eux, montrent que les lots **AA**, **C** et **ASA/AA** représentent une augmentation de cette enzyme contrairement aux lots **Bave/AA** et **Bave** respectivement (**Figure 37**).



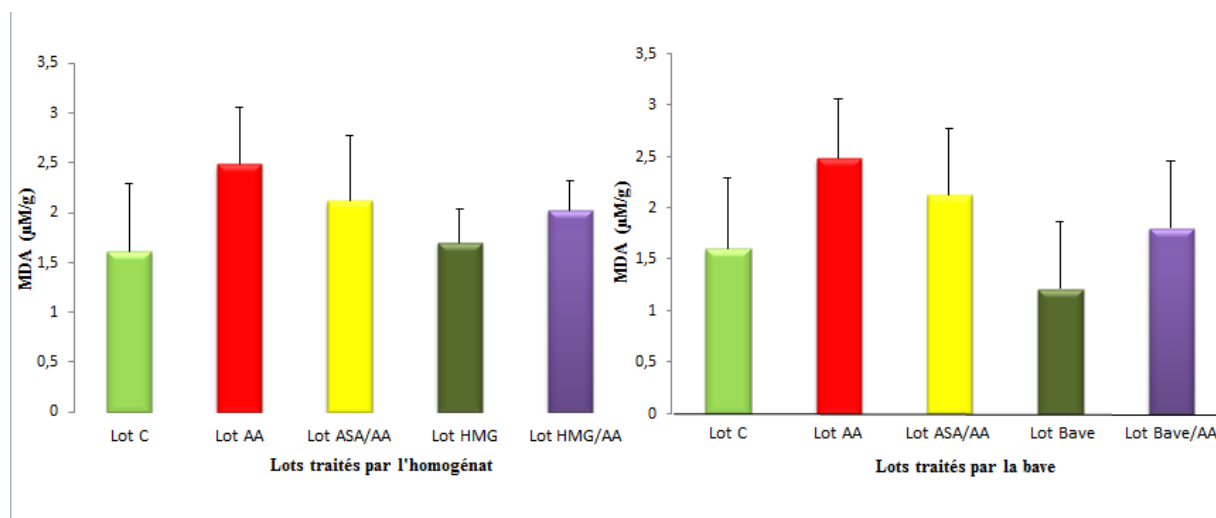
**Figure 37:** taux de la Gamma Glutamyl Transpeptidase ( $\gamma$ GT)

Les résultats de l'évaluation du taux de la CRP montrent que pour les animaux traités avec l'homogénat, on remarque une augmentation très importante pour le lot **AA** par rapport au lot **C**, une augmentation non significative pour le lot **ASA/AA** et une augmentation plus discrète et non significative pour les deux lots **HMG**, et **HMG/AA** par rapport au lot **C**. Aussi, pour les animaux traités par la bave, le lot **AA** représente une augmentation significative de cette protéine ainsi que les lots **ASA/AA**, **Bave** et **Bave/AA**, ils montrent une augmentation contrairement au lot **C**. (**Figure 38**)



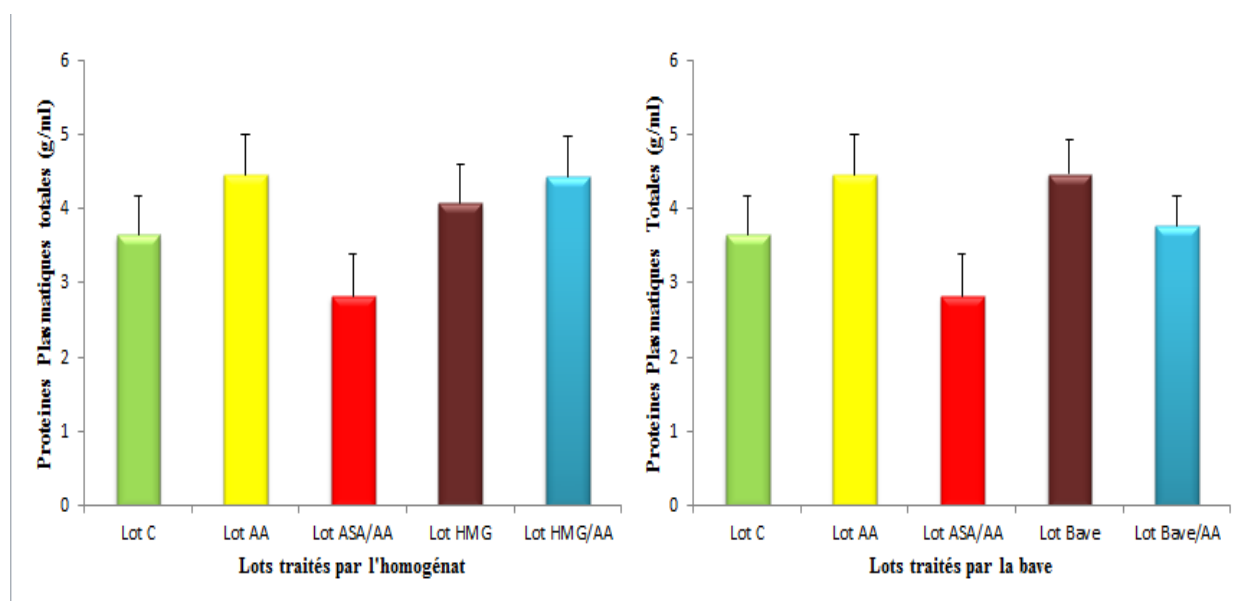
**Figure 38:** taux de la Protéine C Réactive (CRP)

La **Figure 39** présente l'évaluation du taux du malondialdéhyde (MDA). Elle montre au niveau des lots traités par l'homogénat, une augmentation importante pour les lots **AA** et **ASA/AA** par rapport au lot **C**). Une légère augmentation est observée pour les deux lots **HMG** et **HMG/AA**. Les lots traités par la bave présentent des résultats similaires à ceux des lots traités par l'homogénat. On remarque que le lot **AA** représente une augmentation remarquable mais aussi les lots **ASA/AA**, **Bave/AA** et **C** qui montrent une augmentation contrairement au lot **Bave**.



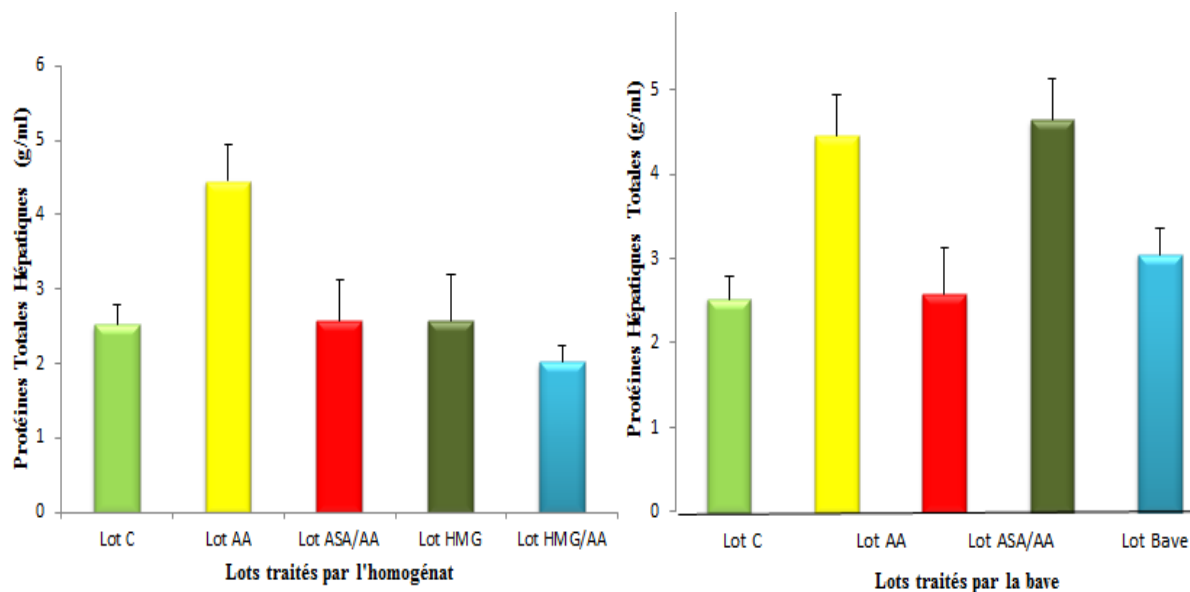
**Figure 39:** taux du Malondialdéhyde (MDA)

Les résultats de la **Figure 40** montrent que pour les groupes traités par l'homogénat, on remarque une augmentation significative des protéines dans le lot **AA** par rapport au lot **C**, une diminution pour le lot **ASA/AA** et une légère augmentation pour les lots **HMG** et **HMG/AA** par rapport au lot **C**. Même remarque pour les groupes traités par la bave où on observe que le lot **Bave** représente une augmentation des protéines plasmatiques ainsi que les lots **AA**, **Bave/AA** et **C** montrent une augmentation contrairement au lot **ASA/AA**.



**Figure 40:** taux des Protéines Totales Plasmatiques

Au niveau de la **Figure 41**, on remarque que pour les lots traités par l'homogénat, il y a une augmentation des protéines hépatiques pour le lot **AA** par rapport au lot **C**, une stabilité pour les lots **ASA/AA** et le lot **HMG** et une diminution pour le lot **HMG/AA** par rapport au lot **C**. Par contre, pour les lots traités par la bave, on remarque que le lot **Bave** représente une augmentation des protéines du foie mais aussi les lots **AA** et **Bave/AA** qui montrent une augmentation encore plus importante de celle du lot **Bave**, contrairement aux lots **ASA/AA** et **C** respectivement.

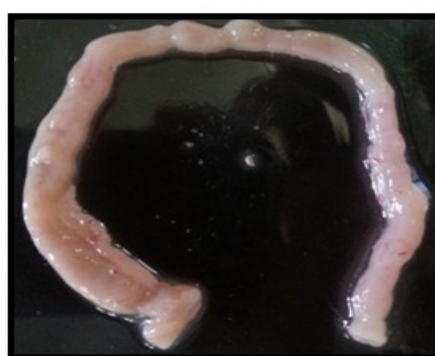


**Figure 41:** taux des Protéines Totales Hépatiques

## 2- Résultats macroscopiques

Les colons ont été excisés et ouverts par incision longitudinale. Après lavage à l'eau physiologique, on effectue une observation macroscopique des colons (**Figure 42**).

Pour le groupe **C** (**Figure 42.a**), le côlon semble normal, rond et sain, sans aucune anomalie macroscopique, contrairement au groupe **AA** (**Figure 42.b**), qui présente une riche vascularisation (flèches rouges). Pour le groupe **ASA/AA** (**Figure 42.c**), le côlon est irrégulier (plat), de couleur terne avec absence de vascularisation. Le Groupe **HMG/AA** (**figure 42.d**) présente un colon dans un état plus sain que le groupe **ASA/AA**, alors que le groupe **Bave/AA** (**Figure 42.e**) montre une vascularisation très faible et a une apparence mince. Les colons des groupes **HMG** (**Figure 42.f**) et **Bave** (**Figure 42.g**) ont conservé une apparence saine, ronde et régulière.

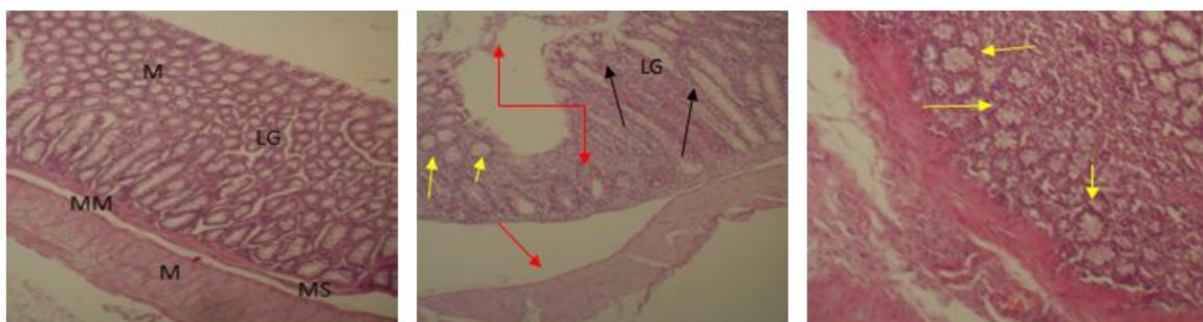


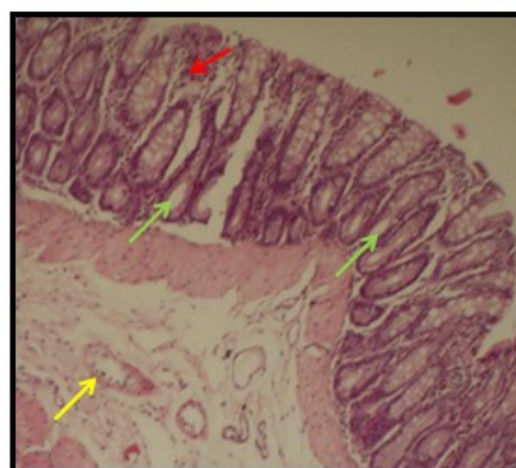
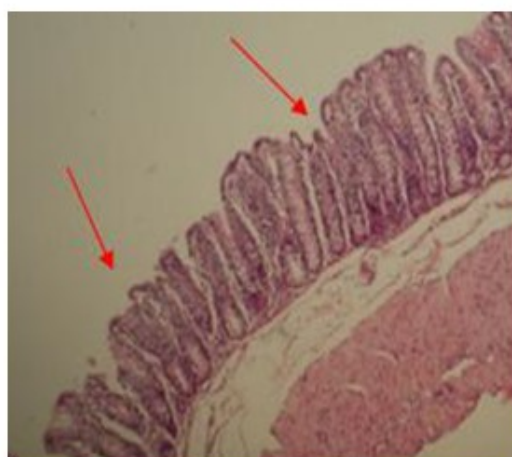
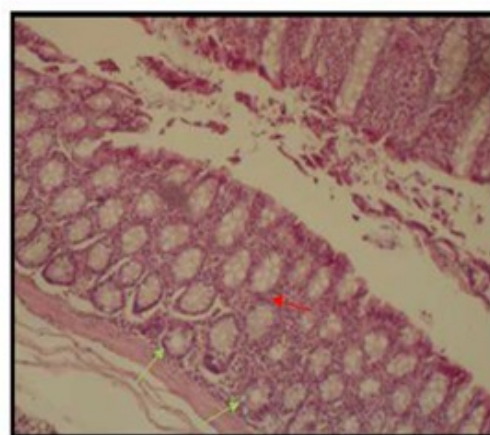
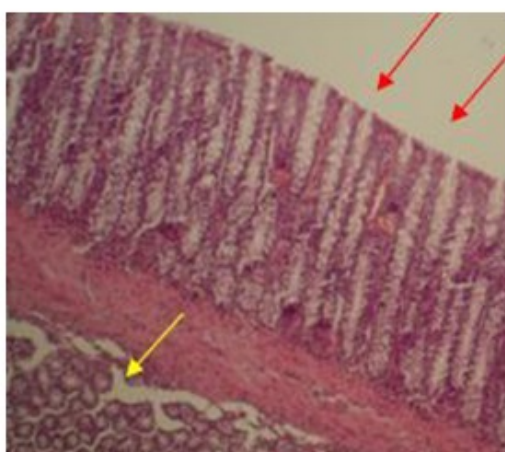
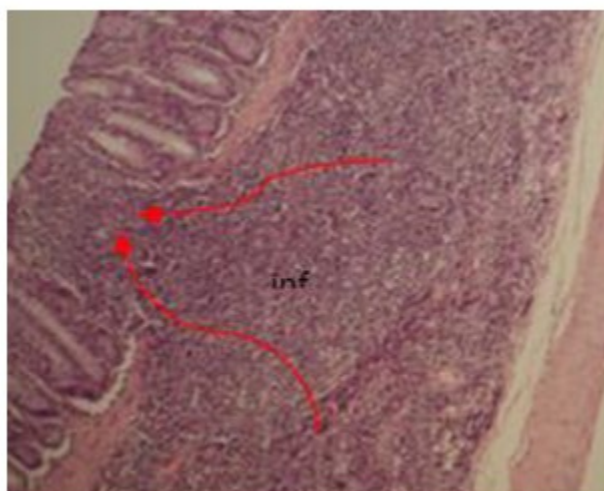
**Figure 42** : Observation macroscopique des colons

### 3- Résultats microscopiques

Des échantillons de colon fixés au formol (10%) ont été incorporés dans de la paraffine et colorés à l'hématoxyline-éosine. L'observation microscopique a été réalisée à l'aide d'un microscope optique (OPTECH®). Les photos suivantes (**Figure 43**) ont été retenues pour l'observation et l'analyse des dommages histologiques et leurs améliorations.

L'architecture de la muqueuse est bien organisée dans le groupe **C** (**Figure 43.a**). Une nécrose étendue (flèches rouges) dans le groupe **AA** a montré un léger agrandissement, une irrégularité (flèches jaunes) et un allongement des canaux (flèches noires) mais sans dysplasie ni hyperplasie (**Figure 43.b**). Le groupe **ASA/AA** a montré une architecture proche de la normalisation avec une infiltration de la muqueuse (flèche infrarouge) (**Figure 43.c**). Le groupe **HMG/AA** (**Figure 43.d**) maintient l'allongement des conduits. Ces derniers semblent plus adhérents l'un à l'autre mais sans infiltration. Les glandes de Lieberkühn ont un diamètre moins large (flèche jaune). Une légère perte de polarité (flèche rouge) a été maintenue. Pour le groupe **Bave/AA** (**Figure 43.e**), certaines cryptes ont été conservées et sont régulières (flèches vertes), une aberration réduite au niveau des cryptes (lyse de certaines cellules épithéliales des muqueuses) et une lamina propria réduite par rapport au groupe **AA** ce qui signifie moins d'infiltration de neutrophiles de la muqueuse (flèche rouge). Dans le **HMG** (**Figure 43.f**), la muqueuse apparaît aussi bien organisée que dans le groupe témoin et la polarité est présente. Même remarque pour le groupe **Bave** (**Figure 43.g**) où on observe des cryptes bien organisées (flèches vertes), une lamina propria normale (flèche rouge) et une couche sous-muqueuse riche en vaisseaux lymphatiques (Flèche orange).







**Figure 43** : Observation microscopique des coupes histologiques des colons

#### IV- DISCUSSION

Le but de cette étude est de trouver un modèle animal permettant de détecter *in vivo* des changements précoces de la muqueuse du côlon qui pourraient induire une inflammation. Ce modèle animal aide aussi à voir si cette inflammation affecterait les cryptes des glandes de Lieberkhun et finalement de tester l'effet de nos extraits sur cette inflammation (guérison et/ou restauration des fonctions des foyers de cryptes). Pour réaliser cette étude, une inflammation colorectale expérimentale a été induite par un agent chimique (acide acétique) chez des rats mâles de la race *Wistar*.

Le modèle de colite induite par l'acide acétique est similaire à la colite ulcéreuse humaine en termes de caractéristiques histologiques. Elle affecte le côlon et induit une inflammation non transmurale, une nécrose massive des couches muqueuses et sous-muqueuses, un œdème de la muqueuse, une infiltration de neutrophiles de la muqueuse et une ulcération sous-muqueuse. La forme protonée de l'acide libère des protons à l'intérieur de l'espace intracellulaire et provoque une acidification intracellulaire intense entraînant des dommages épithéliaux massifs. L'inflammation est la pathogenèse des MICI, et plusieurs voies sont associées à une réponse inflammatoire dans les MICI en raison de la flore intestinale de la muqueuse (MacPherson, 1976). La réponse inflammatoire initiée par l'acide acétique comprend l'activation des voies cyclooxygénase et lipoxygénase (Roncucci et al, 2000, Bird, 1987).

Les résultats révèlent que l'homogénat ainsi que la bave de l'escargot *Helix aspersa* ont une activité protectrice contre la colite expérimentale chez le rat, comme le montrent les évaluations macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

Le groupe **AA** a montré une augmentation de tous les paramètres mais nos deux extraits (homogénat et bave) semblent restaurer ces paramètres. La colite induite a montré des changements dans différents paramètres biochimiques: aspartat aminotransférase (AST), alanine aminotransférase (ALT), gamma glutamyltransférase ( $\gamma$ GT), confirmant les altérations de la fonction hépatique.

L'augmentation des enzymes ASAT et ALAT dans le groupe **AA** suggère une hépatolyse. L'augmentation de l'enzyme  $\gamma$ GT informe d'une cholestase. Les changements

dans les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBAR) et les niveaux de CRP ont confirmé la répercussion de l'inflammation sur la fonction hépatique et suggèrent une augmentation de la production des radicaux libres suivie d'une faible défense antioxydante conduisant à une réponse immunitaire intestinale inadéquate du GALT.

La CRP est l'une des protéines les plus importantes produite rapidement par les hépatocytes au cours d'une réponse en phase aiguë, après stimulation par l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  provenant du site d'inflammation ou de pathologie. La CRP est donc un bon marqueur pour la mesure de l'activité inflammatoire des MICI (Maladie de Crohn par exemple) (Grisham, 1988). Ce travail a montré une augmentation importante de la CRP dans le groupe AA, ce qui signifie que l'inflammation dans ce groupe a persisté en raison de l'absence du traitement. Les Group **HMG/AA**, **Bave/AA** et **ASA/AA** présentent un taux de CRP très faible par rapport à AA, cela indique que nos extraits peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires.

Le malondialdéhyde (MDA) est considéré comme un indicateur important de la peroxydation des lipides (Koutroubakis et al, 2004). Le taux du MDA est élevé chez les rats traités avec de l'acide acétique (AA), cela pourrait être dû à la peroxydation des lipides. Les rats traités avec l'homogénat (**HMG**) ainsi que ceux traités par la **bave** montrent une protection contre la peroxydation lipidique, caractérisée par une diminution significative du taux de MDA. Cela signifie que ces deux extraits contiennent des molécules antioxydantes naturelles. Le stress oxydatif joue un rôle clé dans la pathogenèse des lésions intestinales liées aux MICI (Visavadiya et al, 2005). Les lésions de la muqueuse intestinale dans les MICI sont liées à la fois à la production accrue des radicaux libres et à une faible défense antioxydante endogène (García et al, 2006). Les enzymes antioxydantes, principalement la superoxyde dismutase et la catalase, sont des enzymes défensives de première ligne contre les radicaux libres ainsi que l'acide ascorbique qui est également connu pour contrôler les dommages oxydatifs (Das et Kanodia, 2012).

Dans la présente étude, il a été observé que les extraits de l'escargot *Helix aspersa* augmentent significativement le niveau des protéines totales (plasmatiques et hépatiques) chez les rats souffrants de la colite chimio-induite. Ce résultat suggère qu'ils pourraient contenir certaines de ces enzymes antioxydantes qui peuvent réduire les radicaux libres et donc diminuer les dommages oxydatifs résultants au niveau des tissus.

Les études de recherche dans ce domaine approuvent l'idée que les foyers de cryptes aberrantes (ACF) sont des précurseurs du cancer du côlon (Wargovich, 2010), dont la taille et le nombre sont directement corrélés au risque de développer un cancer du côlon.

Des foyers de cryptes aberrants ont été découverts pour la première fois par Bird en 1987 (Vermeire et al, 2004). La formation des ACF s'accompagne de changements dans la morphologie des cryptes coliques dans les maladies bénignes de l'intestin ainsi que le cancer du côlon (Zama et al, 2007).

L'inflammation non traitée peut évoluer avec le temps jusqu'à une prolifération chaotique des cellules des glandes Lieberkhun et pourrait conduire à l'installation de nodules malins. Notre hypothèse était: si nos extraits pouvaient inhiber l'évolution d'une crypte normale à des foyers de cryptes aberrantes?

L'induction de la colite avec l'acide acétique a induit la formation d'ACF chez les rats des groupes **AA**, **ASA/AA**, **HMG/AA** et **Bave/AA**. Les ACF chez le groupe **AA** sont très bien visibles. La comparaison avec les groupes **HMG/AA** et **Bave/AA** montre que le traitement par les deux extraits de l'escargot *Helix aspersa* a réduit les ACF et l'inflammation causée par l'acide acétique.

La bave de l'escargot *Helix aspersa* est riche en vitamines A, C et E, qui ont des effets nourrissants, anti-inflammatoires et antioxydants. Elle contient aussi une grande quantité de composants mucopolysaccharides riches en glycine, proline et acide glutamique. Ces composants jouent un rôle dans la réparation des ulcères (Shalaby et Shatta, 2013).

Selon de nombreux résultats sur les effets des polyphénols, nous suggérons que les polyphénols contenus dans l'homogénats pourraient exercer un effet cicatrisant sur la muqueuse du côlon et restaurer la flore bactérienne qui est importante dans la réponse immunitaire de la muqueuse.

Ces dernières années, un grand nombre d'études ont attribué un effet protecteur aux polyphénols et aux aliments contenant ces composés en tant que fruits et légumes (quercétine, rutine, myricétine, chrysine, épigallocatechine-3 gallate, épicatechine, catéchine, resvératrol et xanthophumol). Ces composés, ont été signalés pour interférer avec l'initiation, la promotion et la progression du cancer, agissant comme agents chimio-préventifs. Dans des modèles de culture cellulaire, ces composés inhibent la croissance cellulaire, en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose, inhibent la prolifération, l'angiogenèse

et/ou la métastase et présentent des effets anti-inflammatoires et/ou antioxydants mais il est difficile d'extrapoler ces résultats pour les humains.

Les effets de ces micronutriments sur la santé dépendent de la quantité consommée et de la biodisponibilité qui varie d'un polyphénol à l'autre. Cela explique probablement pourquoi les polyphénols les plus abondants ne sont pas nécessairement ceux qui ont la plus grande activité biologique dans les organes cibles et pas nécessairement ceux qui exercent des effets protecteurs sur la santé. À ce jour, aucune quantité quotidienne d'antioxydants n'a été recommandée, mais l'Aprifel (Agence pour les fruits et légumes) nous donne une valeur d'environ 1g/jour de polyphénols (Filisetti- Cozzi et al, 1991).

Les polyphénols trouvés dans l'homogénat pourraient fournir une activité biologique très importante. Bien que de petites quantités de polyphénols soient présentes dans les escargots, ils pourraient, au contraire, fournir une biodisponibilité élevée aux cellules et aux tissus cibles. Le métabolisme des polyphénols nécessite de nombreux autres micronutriments en tant que vitamines (en particulier le cofacteur oxydo-reductant de la niacine ou de la vitamine PP) et des microéléments (sel, cuivre, fer, phosphore).

Tous ces éléments se trouvent dans les extraits de l'escargot *Helix aspersa* (Gomot, 1998, Toader-Williams et Bulletin, 2011). Récemment, notre équipe a montré que les extraits de l'escargot *Helix aspersa* induisent une nécrose qui est associée à la régulation du Bcl2 dans la lignée cellulaire Hs578T du cancer du sein humain (El Ouar et al, 2013). Beaucoup d'autres travaux réalisés par notre équipe ont montré des effets antiprolifératif et anti-inflammatoire des extraits de l'escargot *Helix aspersa* (EL Ouar et al, 2015, Mebirouk et al, 2016, Hatuikulipi et al, 2016).

Comme indiqué par de nombreux auteurs, l'identification de nouveaux classificateurs prédictifs pour la maladie inflammatoire de l'intestin par le profilage d'expression génétique avant et après le traitement avec l'homogénat semble très intéressante d'être étudiée dans ce modèle animal.

Les extraits de l'escargot *Helix aspersa* pourraient probablement jouer un rôle de guérison sur la muqueuse colique et aussi un rôle préventif contre les changements possibles des cryptes normales en cryptes aberrantes (Par régulation des voies de bio signalisation).

Ces extraits pourraient également ajuster la flore bactérienne naturelle pour éviter l'autodestruction du côlon qui pourrait laisser place à l'inflammation (Belkaid et Hand, 2014).

Dans les MICI, il est fréquent d'avoir besoin d'utiliser des médicaments immunosuppresseurs. Ces médicaments, favorisant une réduction du système immunitaire, sont susceptibles de favoriser le développement du cancer et en particulier du lymphome. Cependant, les études de suivis multiples dans les MICI n'ont montré aucun risque accru de cancer, en particulier le lymphome chez les patients traités par des médicaments immunosuppresseurs et la population générale.

Il est à noter que, chez les patients qui ne souffrent pas de MICI, le cancer colorectal se développe le plus souvent à partir d'un polype, c'est-à-dire une tumeur bénigne qui se produit au niveau de la muqueuse du côlon. Après un certain nombre d'années de l'installation de ces polypes, des anomalies architecturales apparaissent, c'est ce qu'on appelle la dysplasie.

Des anomalies du même type peuvent être observées dans la colite ulcéreuse sur une muqueuse plate et sont la cause du cancer. C'est ce type d'anomalie qui est recherché par multiple biopsies systématiques effectuées dans le cadre de la prévention du cancer du côlon dans les MICI.

Nous considérons que ce modèle a été un bon modèle pour induire des dommages dans les cryptes chez les rats des lots traités par rapport aux témoins, mais nous n'avons pas observé de dysplasie ou d'hyperplasie sévères. Nous avons trouvé une légère hypertrophie, une irrégularité et un allongement des canaux; Des résultats concordants avec les caractéristiques des foyers de cryptes aberrantes mais sans dysplasie ou hyperplasie. Nous pouvons suggérer que cette étape soit la première autour de laquelle ces changements doivent être détectés chez les patients souffrant de colite.

#### v- CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons développé un examen *-in vivo-* d'une possible évolution de la FC à l'ACF dans les glandes Lieberkuhn dans la colite chimio-induite chez le rat. La présente étude a révélé des dommages dans les foyers de crypte des glandes de Lieberkuhn. Les FC présentent une apparence aberrante, mais sans hyperplasie ni dysplasie. Ces premiers changements pourraient être considérés comme l'origine du premier foyer inflammatoire.

Les extraits de *Helix aspersa* utilisés dans cette étude peuvent contenir des molécules bioactives avec des effets anti-inflammatoires, immunostimulants et antioxydants.

Ces propriétés nous ont encouragé à étudier l'effet antitumoral des extraits de l'escargot *Helix aspersa*.

# **Chapitre IV**

## **Effet Anti-Tumoral**

## I- INTRODUCTION

Malgré les progrès considérables dans la prévention, le diagnostic et le développement au cours des 25 dernières années, le cancer représente encore la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. La découverte de nouveaux médicaments plus actifs, plus sélectifs et moins toxiques, limitant les effets secondaires délétères et la résistance multidrogue des tumeurs constituera évidemment un défi pour le 21<sup>ème</sup> siècle (Kornprobst, 2005).

Le cancer du côlon est le troisième cancer le plus malin au monde (Shike, 1990) et il est bien connu que les patients atteints d'une colite ulcéreuse ont un risque élevé de cancer colorectal (Devroede et al, 1971, Kewenter et al, 1978, Greenstein et al, 1979): les patients atteints de colite ulcéreuse ont un risque relatif de 2 à 8,2 CRC par rapport à la population normale, représentant environ 2% des personnes atteintes de cancer colorectal (Hardy et al, 2000).

Comme la thérapie des cancers avancés est généralement insuffisante, des efforts continus ont été déployés pour élaborer des stratégies chimio-préventives efficaces pour réduire la morbidité et la mortalité. Il ya eu plusieurs agents qui ont été démontrés pour protéger contre le cancer colorectal dans les études précliniques et épidémiologiques (Hawk et al, 2004, Serrano et al, 2004). La prévention du cancer colorectal est urgente. Une approche possible consiste à utiliser des agents chimio-préventifs alimentaires pour prévenir l'apparition de lésions pré-néoplasiques ou leur progression vers des cancers invasifs. De nombreux agents ont été testés chez des rongeurs (Steele et al, 1998), Et certains sont testés chez des volontaires humains (Montoya et Wargovich, 1997). Cependant, aucun agent n'a encore été démontré être puissant, bon marché, et non toxique pour être administré aux personnes à risque (Langman et Boyle, 1998).

Dans cette partie, et suite aux effets immunostimulant et anti-inflammatoire démontrés précédemment, nous avons jugé utile et nécessaire d'évaluer l'effet antitumoral des extraits de l'escargot *Helix aspersa*, -*in vitro*- et -*in vivo*-.

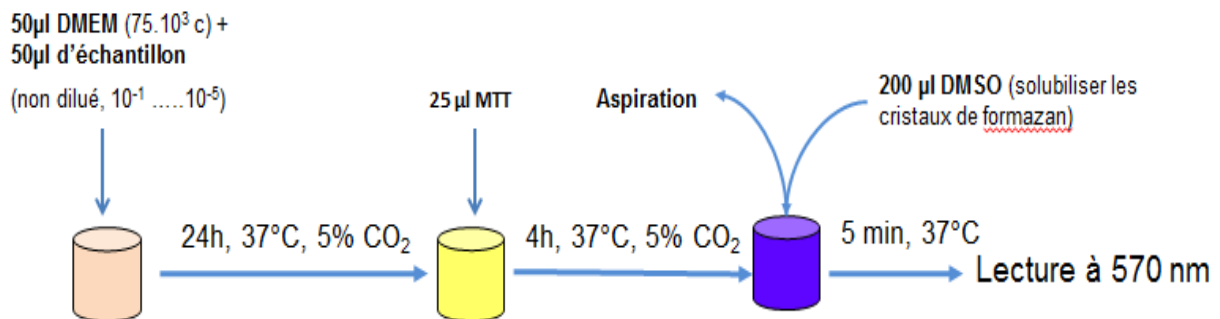


## II- MATERIELS ET METHODES

### 1- Evaluation *-in vitro-* de l'effet antitumoral de l'extrait aqueux sur des cellules tumorales mammaires (MCF-7)

L'effet antitumoral de l'extrait aqueux est mesuré par la réalisation du test MTT qui indique le pouvoir cytotoxique des substances par la révélation du taux de cellules vivantes présentes dans le milieu. Ceci est possible grâce à une enzyme mitochondriale : la succinate déshydrogénase, qui réduit le MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) de couleur jaune en cristaux de formazan de couleur violette.

On ajoute 50µl de l'extrait aqueux (non dilué, dilué au  $10^{-1}$ , dilué au  $10^{-2}$ , dilué au  $10^{-3}$ , dilué au  $10^{-4}$  et dilué au  $10^{-5}$ ) à 50µl d'un milieu DMEM contenant  $75.10^3$  cellules MCF-7, après incubation à 37°C et 5%  $CO_2$  pendant 24h, on ajoute 25µl de MTT à chaque puits. Après 4h d'incubation, on aspire le milieu et le MTT et on rajoute 200µl de DMSO pour la solubilisation des cristaux de formazan et on passe à la lecture de la densité optique à 570nm.



#### Analyse statistique :

L'étude statistique a été réalisée par l'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de comparaison de Dunnett's, en utilisant l'outil statistique XLSTAT 2013 pour Windows Office. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type, avec un seuil de signification statistique fixé à 5%.

## 2- Evaluation *-in vivo-* de l'effet antitumoral de la bave et l'homogénat d'*Helix aspersa* sur des souris *Mus musculus*

Suivant le protocole de (Suzuki et al, 2005), une induction d'une tumeur colique a été réalisée sur 4 lots de souris mâles (7 souris/lot), de poids corporel entre 25 et 30g. Cette induction a été effectuée par une combinaison de deux agents chimiques : un carcinogène colique, l'azoxyméthane (AOM) et un inducteur de colite, le dextran sodium sulfate (DSS).

Les souris ont reçu une dose unique d'AOM (10 mg/Kg de poids corporel) par injection intrapéritonéale, puis une exposition d'une semaine au DSS à 2% dans de l'eau potable, à partir d'une semaine après l'injection de l'AOM. A partir du 8<sup>ème</sup> jour et pendant une semaine, un lot était exposé au Polyéthylène Glycol 8000 (PEG) à 5% dans de l'eau potable, un autre lot a reçu par gavage 5 mg/Kg/J d'homogénat et le dernier lot, 20 ml/Kg/J de bave. Après une semaine de traitement, les 5 lots (**Contrôle, AOM, PEG, HMG et Bave**) ont été maintenus dans des conditions normales du laboratoire, ayant un libre accès à la nourriture et à l'eau potable jusqu'à la fin de l'expérimentation qui dure 14 semaines ce qui est égale à 98 jours. Le protocole des expérimentations est récapitulé dans le tableau suivant (**tableau 7**).

**Tableau 7** : induction de la tumeur colique et traitement des souris par les extraits de l'escargot *Helix aspersa*

<b>Lot Contrôle</b>	<b>Lot AOM/DSS</b>	<b>Lot AOM/DSS + PEG</b>	<b>Lot AOM/DSS + HMG</b>	<b>Lot AOM/DSS + Bave</b>
<b>J1</b> : injection ip de 300 µl de NaCl	<b>J1</b> : injection ip de 10 mg/Kg D'AOM	<b>J1</b> : injection ip de 10 mg/Kg D'AOM	<b>J1</b> : injection ip de 10 mg/Kg D'AOM	<b>J1</b> : injection ip de 10 mg/Kg D'AOM
<b>J7</b> : DSS 2% pendant une semaine	<b>J7</b> : DSS 2% pendant une semaine	<b>J7</b> : DSS 2% pendant une semaine	<b>J7</b> : DSS 2% pendant une semaine	<b>J7</b> : DSS 2% pendant une semaine
<b>J8</b> : injection ip de 300 µl de NaCl	<b>J8</b> : injection ip de 300 µl de NaCl	<b>J8</b> : PEG 5% pendant une semaine	<b>J8</b> : gavage de 5 mg/Kg/j pendant une semaine	<b>J8</b> : gavage de 20 ml/Kg/j pendant une semaine
<b>J8-J98</b> : libre accès à la nourriture et l'eau potable	<b>J8-J98</b> : libre accès à la nourriture et l'eau potable	<b>J8-J98</b> : libre accès à la nourriture et l'eau potable	<b>J8-J98</b> : libre accès à la nourriture et l'eau potable	<b>J8-J98</b> : libre accès à la nourriture et l'eau potable

Tous les animaux ont été sacrifiés à la fin de l'étude (semaine 14) par overdose de chloroforme. Des prélèvements sanguins ont été effectués pour la réalisation des frottis et pour le dosage de la CRP. Les colons prélevés ont été coupés longitudinalement le long de l'axe principal et lavés avec une solution saline.

Les côlons entiers ont été inspectés macroscopiquement, coupés, fixés dans du formol tamponné à 10% pendant au moins 24 h, inclus dans de la paraffine et colorés par l'hématoxyline-éosine pour l'observation microscopique et l'étude histologique.

### III- RESULTATS

#### 1- Evaluation *-in vitro-* de l'effet antitumoral de l'extrait aqueux sur des cellules tumorales mammaires (MCF-7)

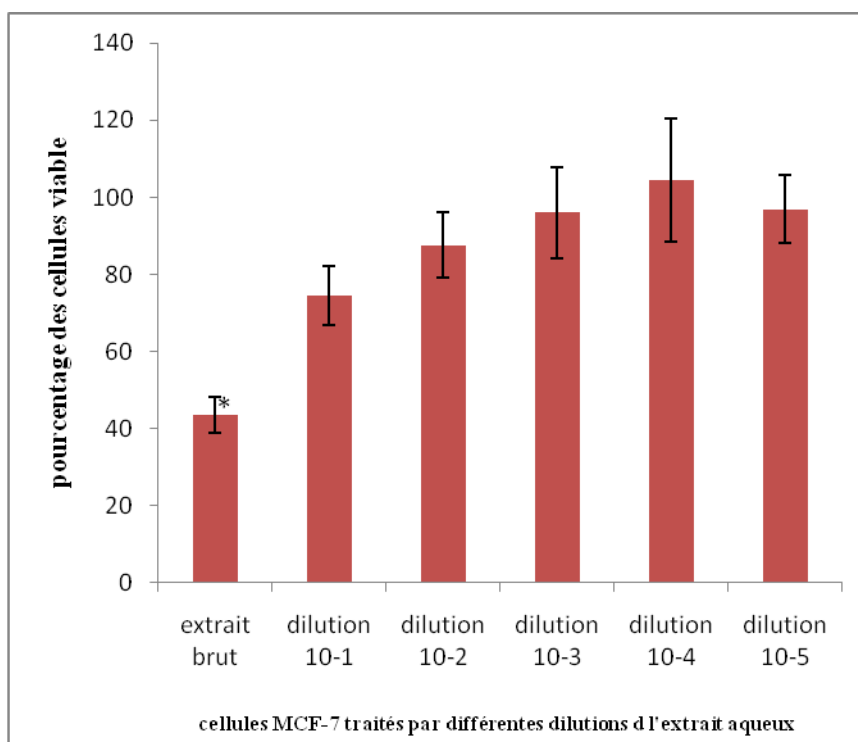
La mesure du pourcentage des cellules vivantes pour le test MTT a été réalisée par rapport à des puits contrôles contenant des cellules non traitées par l'extrait aqueux d'*Helix aspersa*. Les résultats ont été exprimés par pourcentage de cellules viables :

$$\% \text{ cellules viables} = (\text{DO}_{\text{test}} / \text{DO}_{\text{témoin}}) \times 100$$

Après traitement des cellules par différentes dilutions de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa* et après la mesure des densités optiques des différents puits à 570 nm, les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 8** et la **figure 46**.

**Tableau 8** : pourcentage des cellules viables après traitement par différentes dilutions de l'extrait aqueux

Extrait aqueux	% cellules viables
Extrait aqueux brut non dilué	43,61
Extrait aqueux dilué à $10^{-1}$	74,48
Extrait aqueux dilué à $10^{-2}$	87,62
Extrait aqueux dilué à $10^{-3}$	95,97
Extrait aqueux dilué à $10^{-4}$	104,38
Extrait aqueux dilué à $10^{-5}$	96,89



(Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type, \* $P < 0.05$  en comparaison avec le groupe dilution  $10^{-4}$ )

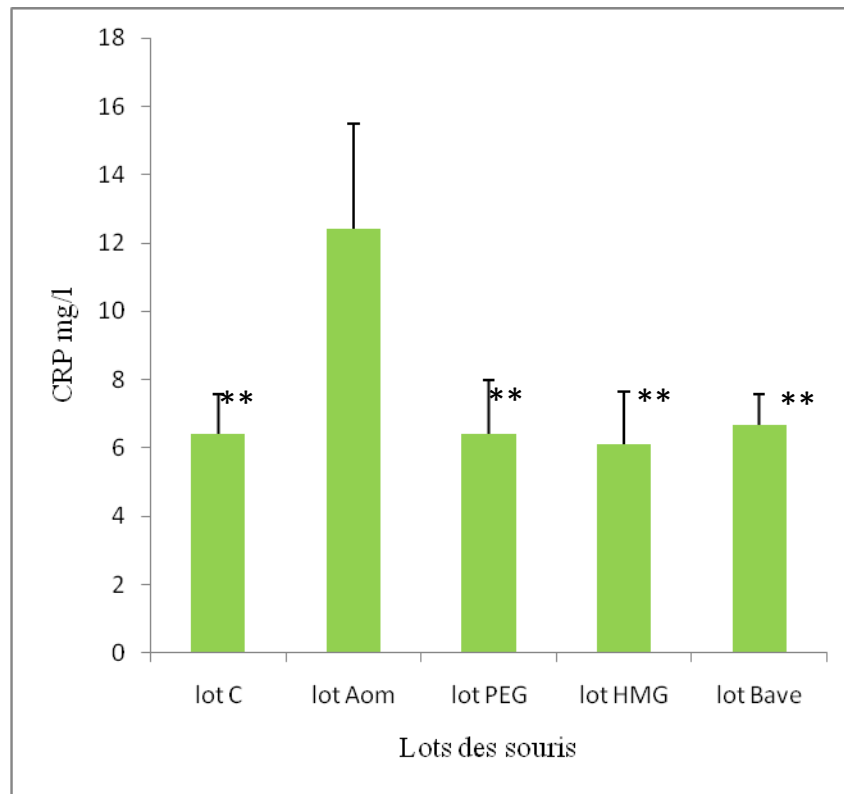
**Figure 44** : effet antiprolifératif de l'extrait aqueux sur des cellules tumorales mammaires MCF-7

Au niveau du **tableau 8** ainsi que la **figure 44** on remarque que l'extrait aqueux, brut et non dilué de l'escargot *Helix aspersa*, a permis une viabilité des cellules mammaires tumorales à 43,61%, ce qui signifie que cet extrait a inhibé la croissance des cellules tumorales à 56,39%.

## 2- Evaluation *-in vivo-* de l'effet antitumoral de l'extrait aqueux sur des souris *Mus musculus*

### 2.1- Dosage de la protéine C réactive (CRP)

Après prélèvement sanguin, la CRP (marqueur de l'inflammation) a été dosée, les résultats du dosage (**figure 45**) montrent que le groupe **AOM** présente la valeur la plus élevée de la CRP tandis que les groupes restants : **PEG**, **HMG** et **Bave** présentent des valeurs de CRP similaires à celle du groupe témoin **C**.



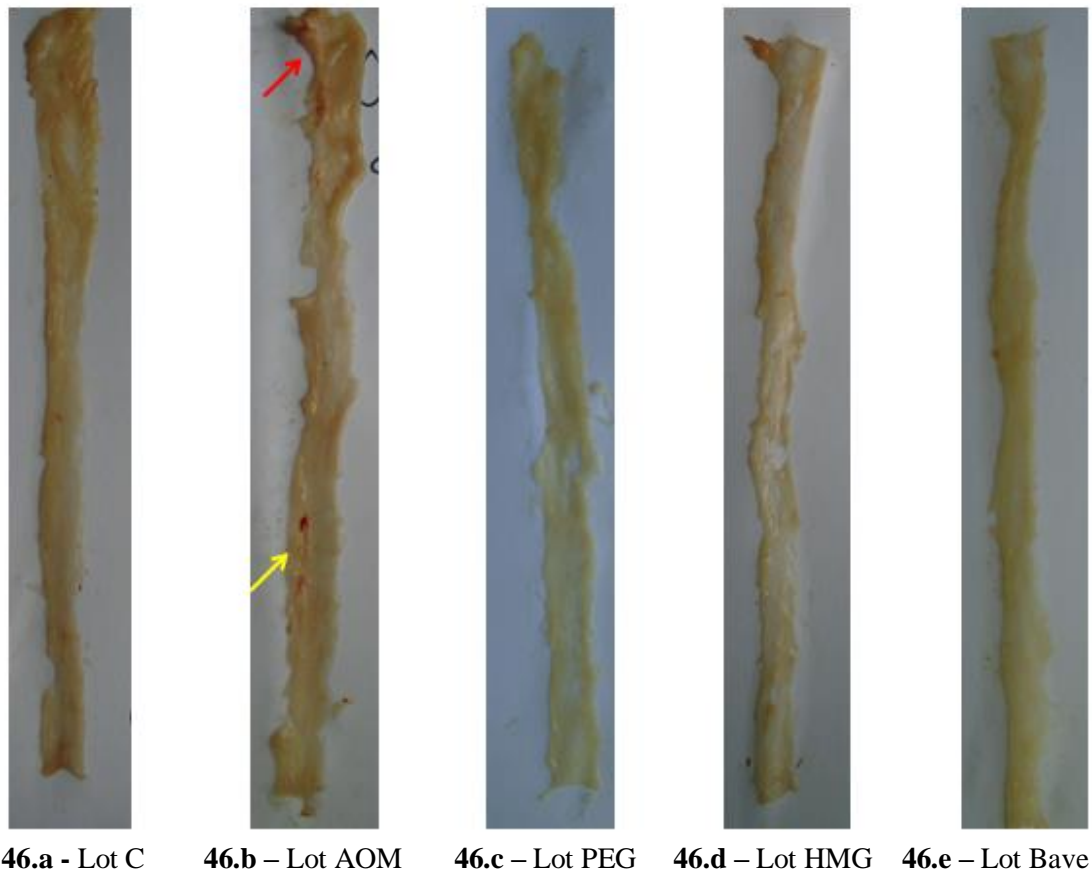
(Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, \*\*P<0.01 en comparaison avec le lot AOM)

**Figure 45** : taux de la protéine C réactive (CRP)

## 2.2- Observation macroscopique

Après sacrifice des animaux à la fin de l'expérimentation, les colons ont été prélevés, coupés longitudinalement le long de l'axe principal, lavés avec une solution saline et observés à l'œil nu.

L'aspect macroscopique des colons est présenté par la **figure 46**. On remarque au niveau du colon **AOM**, quelques nodules (flèche rouge) et une riche vascularisation (flèche jaune). Les colons des groupes restants **PEG**, **HMG** et **Bave** présentent un aspect normal, similaire à celui du groupe **C**.



**Figure 46** : aspect macroscopiques des colons

### 2.3- Observation microscopique

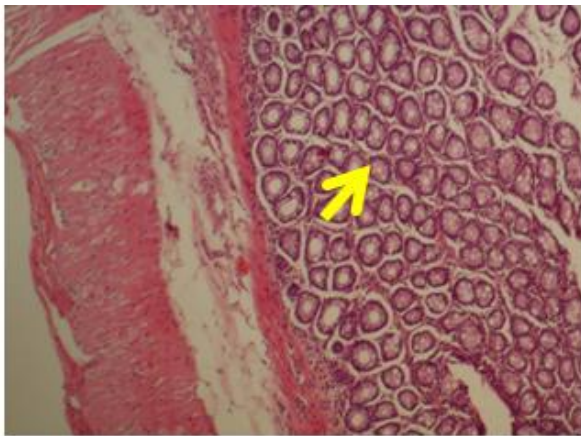
Des échantillons de colon fixés au formol (10%) ont été incorporés dans de la paraffine et colorés à l'hématoxyline-éosine. L'observation microscopique a été réalisée à l'aide d'un microscope optique (OPTECH®) pour le groupe **C** et un microscope (LEICA®) pour les groupes **AOM**, **PEG**, **HMG** et **Bave**. Les photos suivantes ont été retenues pour l'observation et l'étude histologique.

On remarque que l'architecture de la muqueuse est bien organisée dans le groupe **C** et que les glandes de Lieberkuhn ont un aspect normal (aspect de rose) avec des contours des cellules caliciformes bien définis (flèche jaune) (**Figure 47.a**).

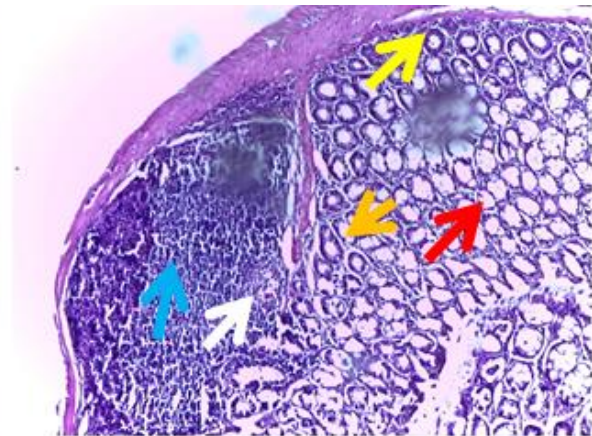
Contrairement au groupe **C**, le groupe **AOM** représente l'évolution et la transformation du profil normal vers le profil tumoral de la muqueuse colique (**Figures 47.b, 48.a**). On remarque au niveau de la muqueuse et près de la lame basale, la présence des glandes de Lieberkuhn normales (aspect de rose) avec des contours cellulaires bien définis (flèches

jaune) (**Figures 48.b et 48.c**). En s'éloignant de la lame basale, les glandes commencent à se dilater (flèche rouge) où on peut remarquer un fond clair mais gardent toujours une forme ronde (**Figures 48.d et 48.e**). D'autres glandes présentent une forme hypertrophiée (flèche orange) (**Figures 48.f et 48.g**). Après dilatation et hypertrophie des glandes, on remarque une déstructuration de la muqueuse (flèche blanche), les contours cellulaires commencent à disparaître et le fond clair diminue (**Figures 48.h et 48.i**). Suite à la destruction des glandes, les noyaux saturent l'espace, la prolifération anarchique des cellules prend place (flèche bleue) (**Figures 48.j et 48.k**), d'où l'installation de la tumeur colique.

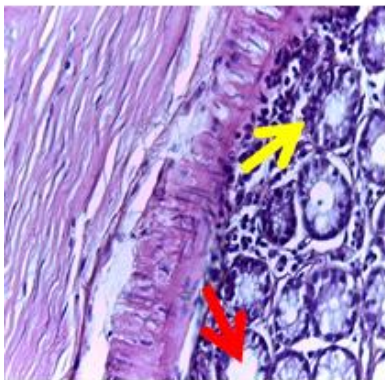
Les groupes ayant reçu un traitement par le PEG (**Figures 47.c et 49**), l'homogénat (**Figures 47.d et 50**) et la bave (**Figures 47.e et 51**) montrent des glandes de forme normale (aspect de rose) (flèches jaunes) avec quelques glandes dilatées résultant de la tumeur colique induite par l'AOM/DSS au début de l'expérimentation et avant le traitement (flèches rouges).



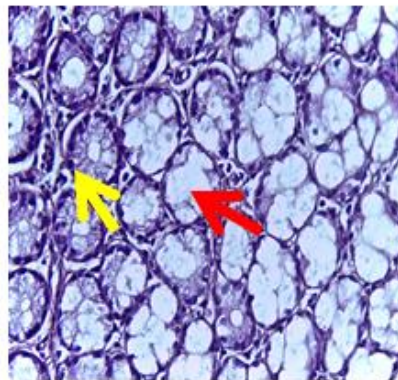
47.a – Lot C x 10



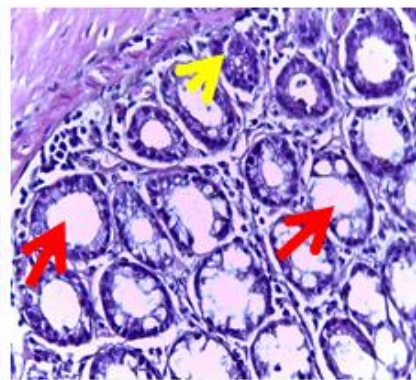
47.b – Lot AOM x 10



47.c – Lot PEG x 40

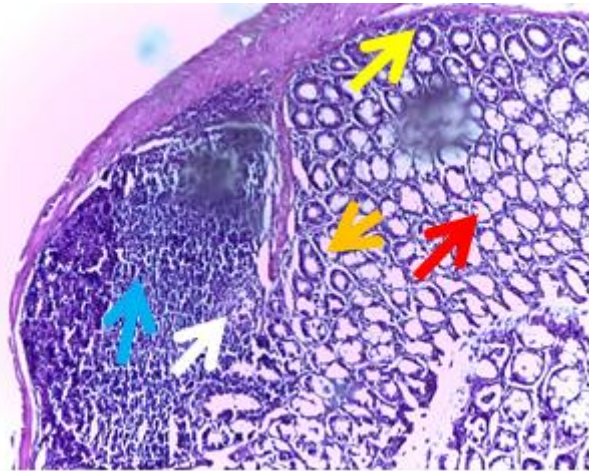


47.d – Lot HMG x 40

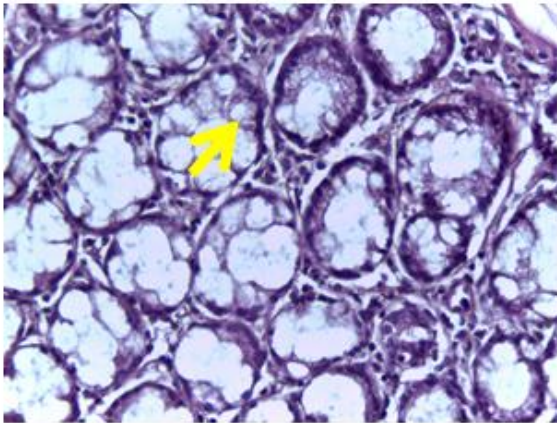


47.e – Lot Bave x 40

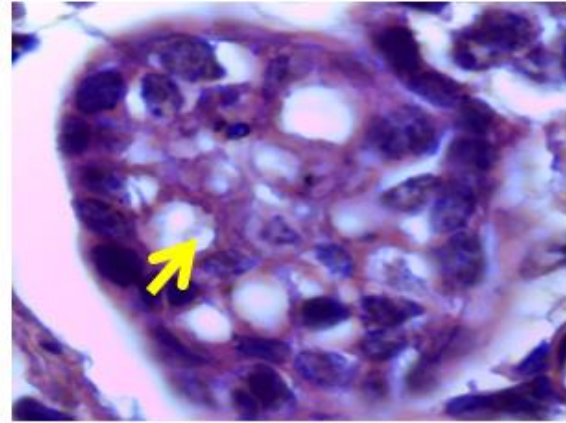
**Figure 47** : observation microscopique des coupes histologiques des colons



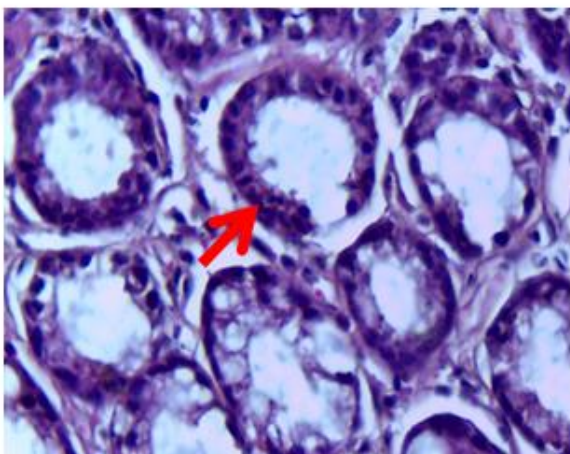
48.a – Lot AOM x 10



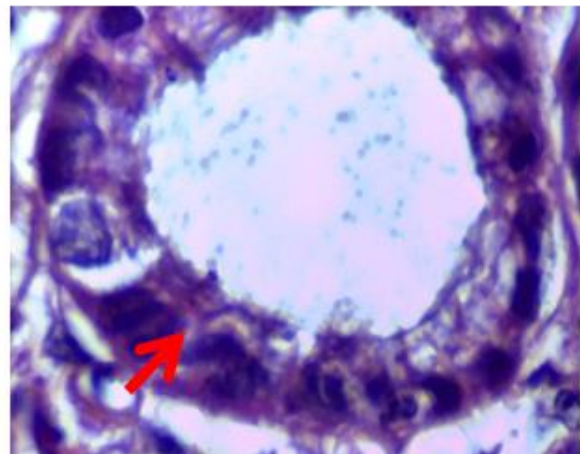
48.b – Glande normales (flèche jaune x40)



48.c – Glandes normales (fleche jaune x100)



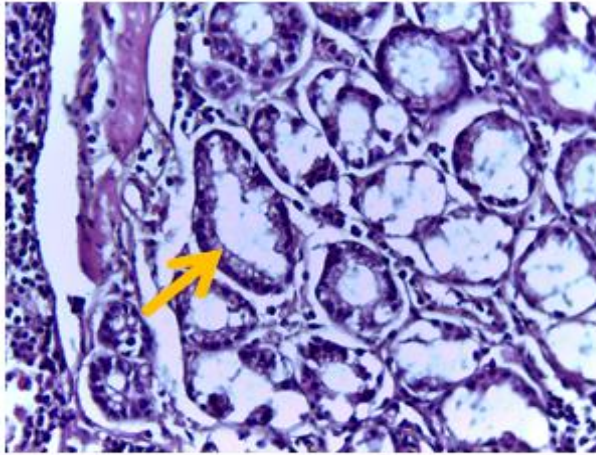
48.d – Glandes dilatées (flèche rouge x40)



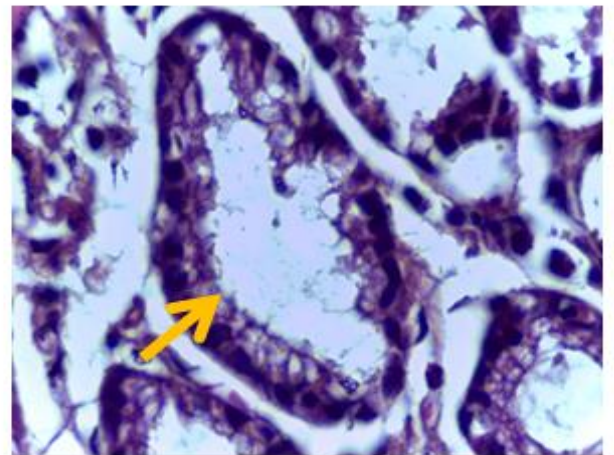
48.e – Glandes dilatées (fleche rouge x100)

**Figure 48** : observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot AOM

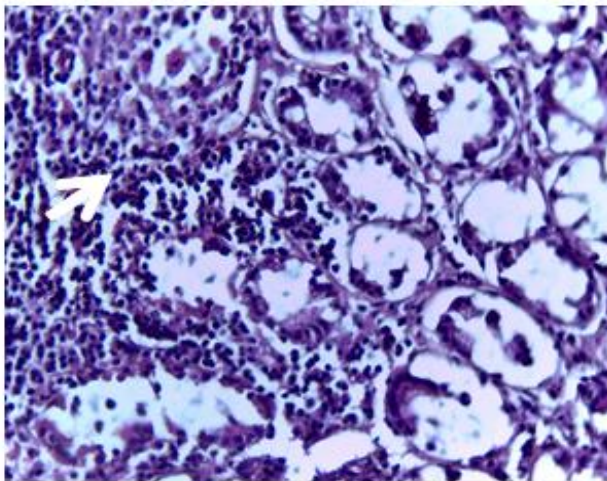




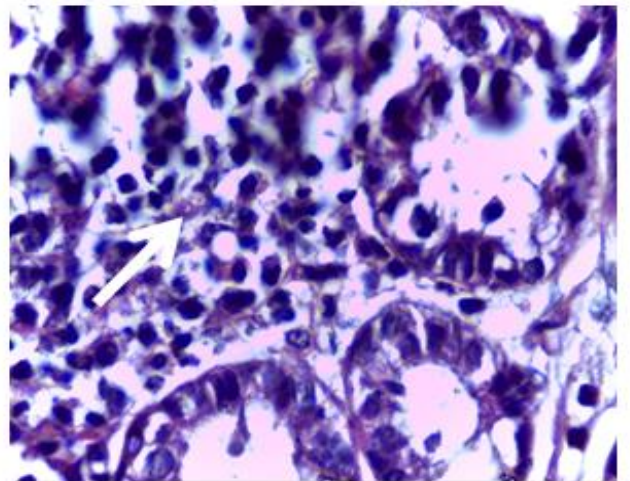
48.f – Glandes hypertrophiées (flèche orange x40)



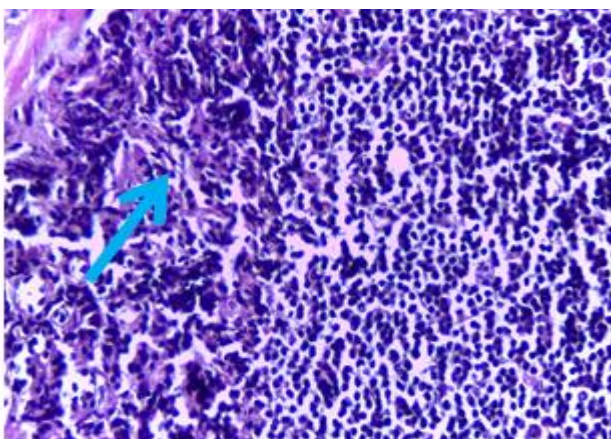
48.g – Glandes hypertrophiées (flèche orange x100)



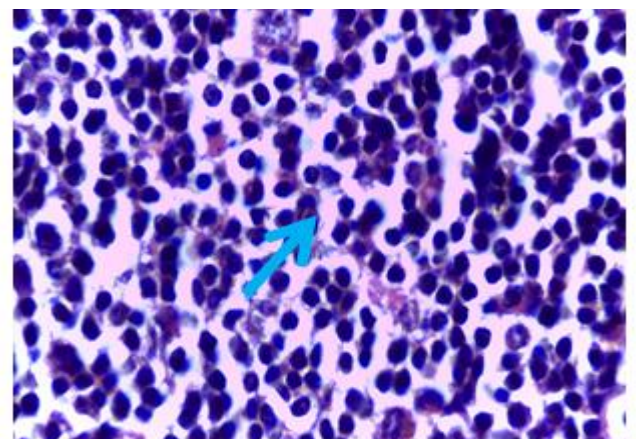
48.h – destruction de la muqueuse (flèche blanche x40)



48.i – destruction de la muqueuse (flèche blanche x100)

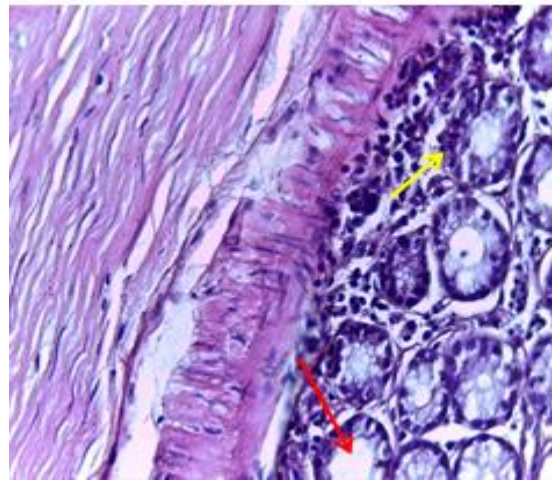


48.j – prolifération anarchique des cellules  
(Flèche bleue x40)

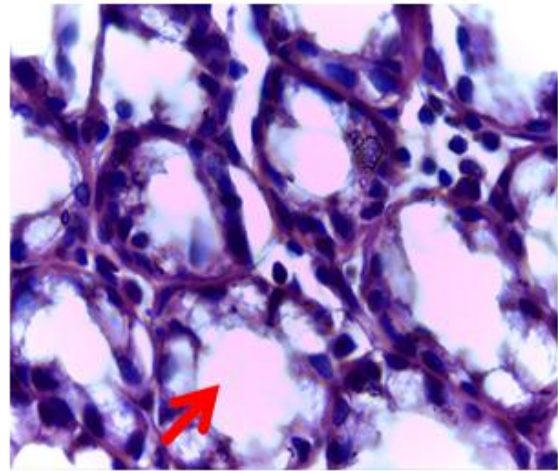
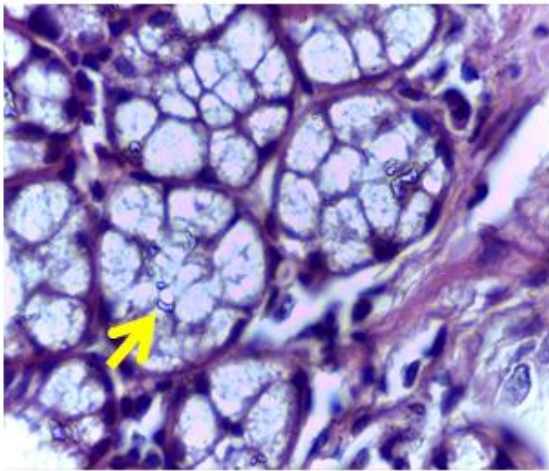


48.k – prolifération anarchique des cellules  
(Flèche bleue x100)

**Figure 48 :** observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot AOM

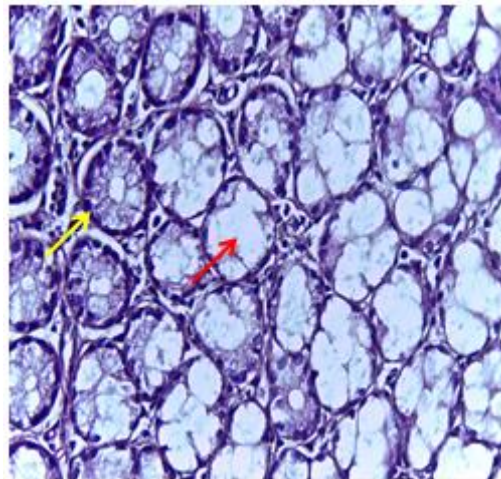


49.a – Lot PEG x 10

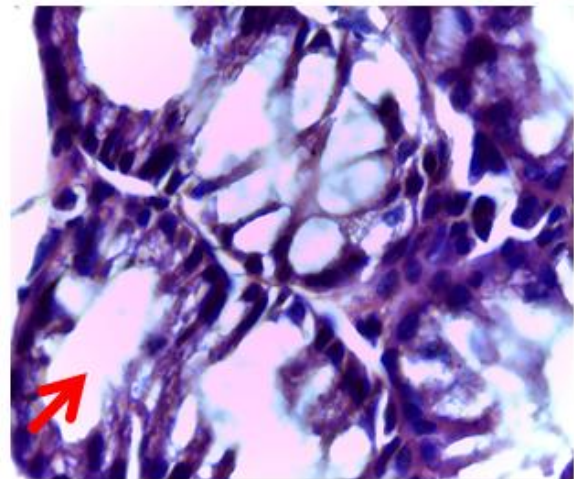
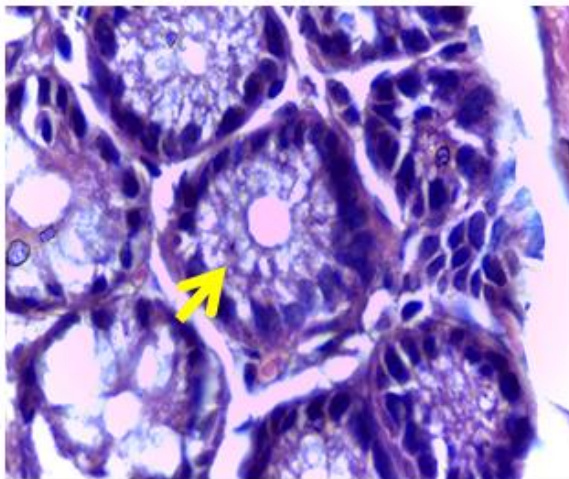


491.b – Glande normales (flèche jaune x100) 49.c – Glandes dilatées (flèche rouge x100)

**Figure 49** : observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot PEG

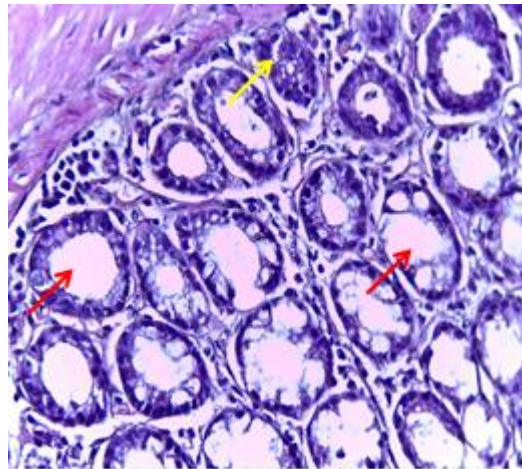


50.a – Lot HMG x 10

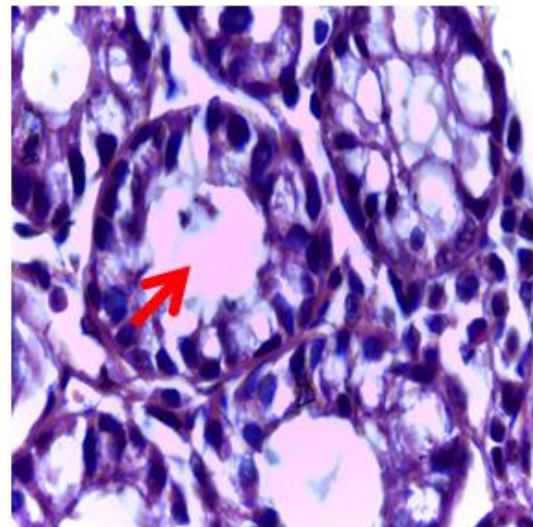
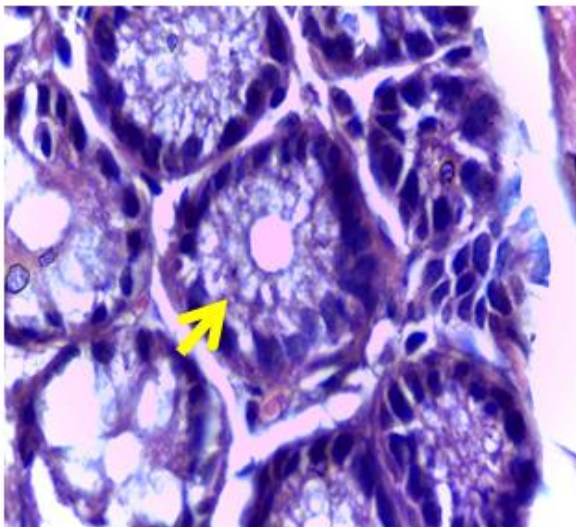


50.b – Glande normales (flèche jaune x100) 50.c – Glandes dilatées (flèche rouge x100)

**Figure 50** : observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot HMG



51.a – Lot Bave x 10



51.b – Glande normales (flèche jaune x100) 51.c – Glandes dilatées (flèche rouge x100)

Figure 51 : observation microscopique des coupes histologiques des colons du lot Bave

## IV-DISCUSSION

### 1- Evaluation *-in vitro-* de l'effet antitumoral de l'extrait aqueux sur des cellules tumorales mammaires (MCF-7)

L'effet antitumoral, ou la capacité de cytotoxicité de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa* a été étudié, *in vitro*, par un test de viabilité cellulaire, le test MTT. C'est un test rapide qui permet, en utilisant une seule plaque à 96 puits, d'étudier une échelle plus vaste de concentration/dilution en drogue et cela avec plusieurs drogues et en quadruplicate.

Le test utilise le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényl tétrazolium). Il repose sur la capacité des mitochondries fonctionnelles des cellules vivantes à réduire le MTT en cristaux de formazan, solubles dans le DMSO et quantifiable par mesure colorimétrique. Il permet donc d'évaluer les effets des traitements étudiés sur la prolifération globale, en déterminant la concentration en extrait qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire (IC<sub>50</sub>), en la comparant à la condition contrôle qui n'as pas été traitée par l'extrait en question (Puyo, 2011)

L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule).

La succinate déshydrogénase est une enzyme présente chez un très grand nombre d'êtres vivants. On la trouve ainsi dans la membrane plasmique des bactéries et dans la membrane mitochondriale interne des eucaryotes, notamment des mammifères. Elle présente la particularité d'intervenir à la fois dans le cycle de Krebs et dans la chaîne de transport d'électrons de la phosphorylation oxydative (Oyedotun et Lemire, 2004).

Au niveau du **tableau 8** ainsi que la **figure 44**, et en comparant les résultats avec la dilution au 10<sup>-4</sup> qui a donné 100% de cellules viables (c'est-à-dire la même quantité des cellules initiales), on remarque que l'extrait aqueux, brut et non dilué de l'escargot *Helix asersa*, a permis une viabilité des cellules mammaires tumorales à 43,61%, ce qui signifie que cet extrait a inhibé la croissance des cellules tumorales à 56,39%.

## 2- Evaluation *-in vivo-* de l'effet antitumoral de l'extrait aqueux sur des souris *Mus musculus*

### 2.1- Dosage de la protéine C réactive (CRP)

La **figure 45** montre une diminution significative du taux de la CRP pour les lots **HMG** et **Bave**, des taux similaires à celui du lot **C** et beaucoup inférieurs, et d'une façon remarquable, par rapport à celui du lot **AOM**.

Le taux élevé de la CRP au niveau du lot **AOM** confirme l'action du DSS, non seulement pour le lot **AOM** mais aussi pour les lots **HMG** et **Bave**. Cependant, la diminution du taux de la CRP pour les lots **HMG** et **Bave**, prouve que nos deux extraits ont réussi à rapporter la valeur de la CRP à la normale (similaire à celle du lot **C**), même après l'installation de la tumeur. Ceci suggère un effet antitumoral des deux extraits, en plus de leur effet anti-inflammatoire mis en évidence dans le chapitre précédent.

### 2-2- Observation macroscopique :

Les résultats du test MTT ont été confirmés *in vivo*, lors de l'évaluation de l'effet antitumoral de deux autres extraits de l'escargot *Helix aspersa* : l'homogénat et la bave. L'étude de l'effet antitumoral de ces deux extraits a été réalisée suivant le protocole de (Suzuki et al, 2005). Une tumeur du colon a été induite par la combinaison de deux agents chimiques : l'AOM (azoxyméthane, un carcinogène colique) et le DSS (le dextran sodium sulfate, un inducteur de colite).

L'observation de l'aspect macroscopique des colons du groupe **AOM (Figure 46.b)**, a révélé la présence de nodules ou boursouffures au niveau de la muqueuse colique (flèche rouge) dues au pouvoir cancérigène de l'AOM. On a aussi remarqué une riche vascularisation, ce qui résulte de l'effet du DSS qui est un inducteur de colite ulcéreuse. Ces résultats confirment ceux présentés par (Suzuki et al, 2005). Les groupes restants, **PEG (figure 46.c)**, **HMG (figure 46.d)** et **Bave (figure 46.e)** montrent une muqueuse nette, saine, similaire à celle du groupe témoin **C (figure 46.a)**. L'absence des nodules et de la vascularisation indique la disparition de la tumeur colique induite par l'AOM et favorisée par le DSS.

### 2.3- Observation microscopique

Pour confirmer les hypothèses précédentes, une étude histologique a été effectuée pour tous les groupes. Les **figures 47.b et 48** confirment l'installation de la tumeur colique pour le groupe ayant reçu uniquement de l'AOM et du DSS. On observe clairement l'évolution de l'aspect de la muqueuse colique de la forme normale à la forme maligne. Au niveau de cette coupe, on observe près de la lame basale, la présence de quelques glandes de Lieberkuhn d'une forme normale (aspect de rose) avec des contours cellulaires bien définis (flèche jaune). C'est la forme normale de la muqueuse semblable à celle du groupe témoin (**figure 47.a**). Pas très loin des glandes normales, on remarque la dilatation d'autres glandes qui laisse paraître un fond clair (flèche rouge). Juste à côté, d'autres glandes prennent une forme hypertrophiée (flèche orange). Un excès d'hypertrophie des glandes va tout de suite provoquer une destruction des glandes et un défilage de la muqueuse (flèche blanche), ce qui va causer une prolifération anarchique des cellules et une saturation de noyaux (flèche bleue).

Ces résultats confirment que l'injection de l'AOM (10 mg/Kg de poids corporel) en combinaison avec l'administration du DSS à 2% pendant une semaine, a induit une tumeur au niveau de la muqueuse colique.

La relation entre l'inflammation et le cancer a été suggérée depuis longtemps (Balkwill&Mantovani, 2001). En ce qui concerne le colon, on a constaté que le risque de cancer colorectal augmente par rapport aux degrés d'inflammation et à la durée de la maladie et ce dans les MICI telles que la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (Eaden et al, 2001).

La dose du DSS administrée a été choisie en se référant à l'étude de la capacité de promotion tumorale du DSS dans les souris (Suzuki et al, 2005). Cette étude a révélé qu'un certain nombre de néoplasmes coliques (adénome et adénocarcinome) se sont développés chez des souris traitées avec du DSS 2% après l'administration d'AOM, ce qui peut favoriser la carcinogenèse du côlon induite par l'AOM.

Des études ont reporté que l'exposition au DSS dans l'eau potable à une dose de 2% pendant une semaine, et après une seule injection intra péritonéale d'AOM (10 mg / kg de poids corporel), pourrait produire un certain nombre de néoplasmes coliques avec une mutation du gène  $\beta$ -caténine (le gène CTNNB1) chez des souris ICR mâles à court terme (20 semaines)

(Tanaka et al, 2003) suggérant ainsi un pouvoir promoteur de tumeur exercé par le DSS. La protéine codée par ce gène fait partie d'un complexe de protéines qui constituent des jonctions adhérentes. Ces jonctions sont nécessaires pour la création et le maintien de couches cellulaires épithéliales en régulant la croissance cellulaire et l'adhésion entre les cellules. La protéine codée ( $\beta$ -caténine) ancre également le cytosquelette d'actine et peut être responsable de transmettre le signal d'inhibition du contact qui fait que les cellules cessent de se séparer une fois que la feuille épithéliale est terminée. Une autre étude a confirmé l'effet du DSS sur la carcinogénèse du côlon des souris initié par l'AOM et a suggéré une inflammation et un stress nitrosant (Suzuki et al, 2004).

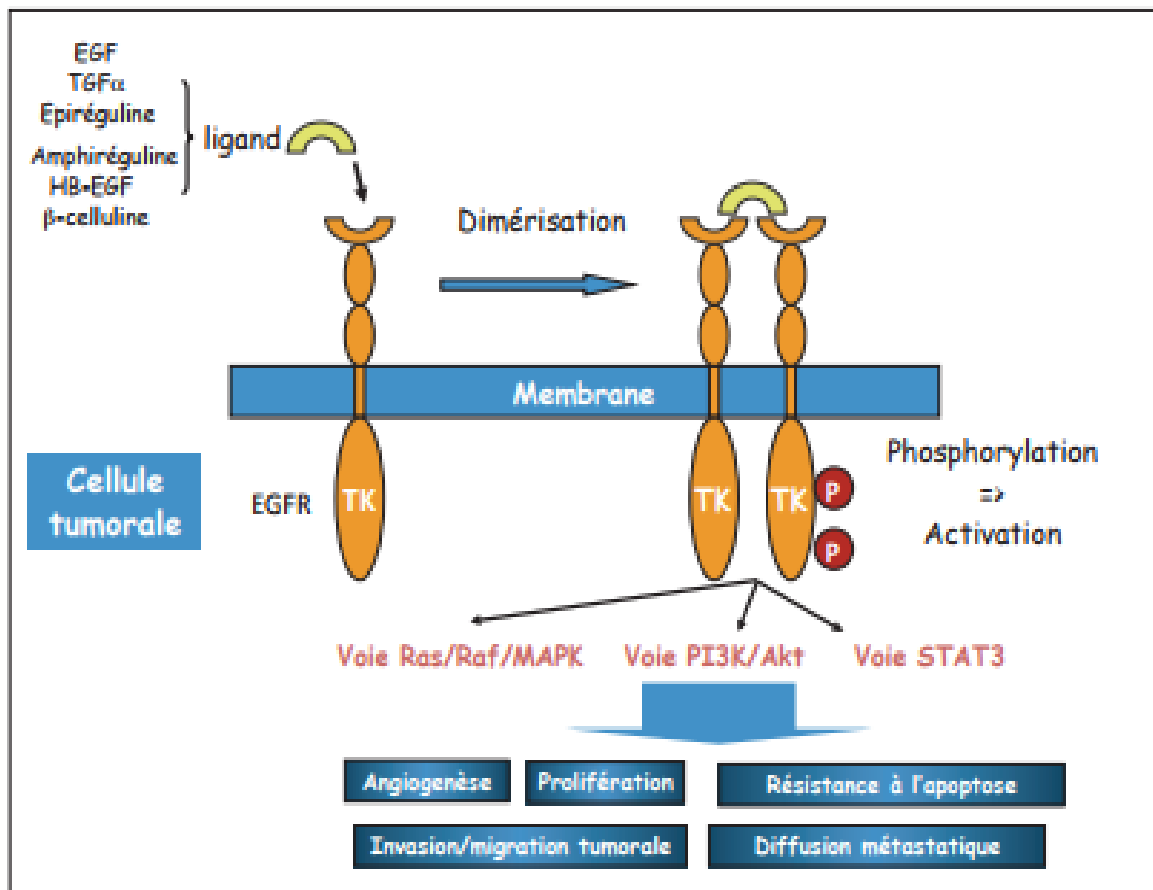
L'azoxyméthane (AOM) est un agent cancérigène puissant utilisé pour induire un cancer du côlon chez le rat et la souris. Il a été utilisé dans des études évaluant l'efficacité du traitement préventif pour la carcinogénèse chimio induite chez les rongeurs (Escribano, 2004. Marotta, 2003 et Orii, 2003).

Des changements ou des anomalies dans la signalisation du facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) sont détectés dans des tumeurs développées par des souris traitées avec AOM. Dans les cellules normales, le TGF- $\beta$ , agissant par l'intermédiaire de sa voie de signalisation, arrête le cycle cellulaire en phase G1 et stoppe la prolifération, la différenciation et induit l'apoptose. Quand une cellule est transformée en une cellule cancéreuse, des parties du TGF- $\beta$  sont mutées, donc le TGF- $\beta$  ne contrôle plus la cellule. Les fibroblastes vont également proliférer. Ce TGF- $\beta$  muté agit sur les cellules stromales environnantes, les cellules immunitaires, endothéliales et les cellules musculaires. Il provoque à contrario l'angiogénèse et l'immunosuppression et rend la tumeur invasive. Le TGF- $\beta$  muté modifie également le comportement des cellules-T, qui normalement attaquent les tumeurs et provoquent des réactions inflammatoires (Guda, 2001. Guda, 2003).

Le traitement par l'azoxyméthane active la tyrosine kinase intrinsèque du récepteur EGF (EGFR) tout en stimulant la synthèse du TGF- $\alpha$  (Relan, 1995). La voie de signalisation du facteur de croissance transformant alpha (TGF- $\alpha$ ) / EGFR semble jouer un rôle critique dans la progression du cancer du côlon (Sasaki, 2008). Il a été démontré que l'EGFR joue un rôle important dans la genèse de nombreux cancers épithéliaux dont les cancers colorectaux où ce récepteur est surexprimé dans 30 à 85 % des cas (Cohen et al, 2005). L'EGFR est composé d'un domaine extracellulaire assurant la fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine effecteur tyrosine-kinase intracellulaire. L'EGFR possède



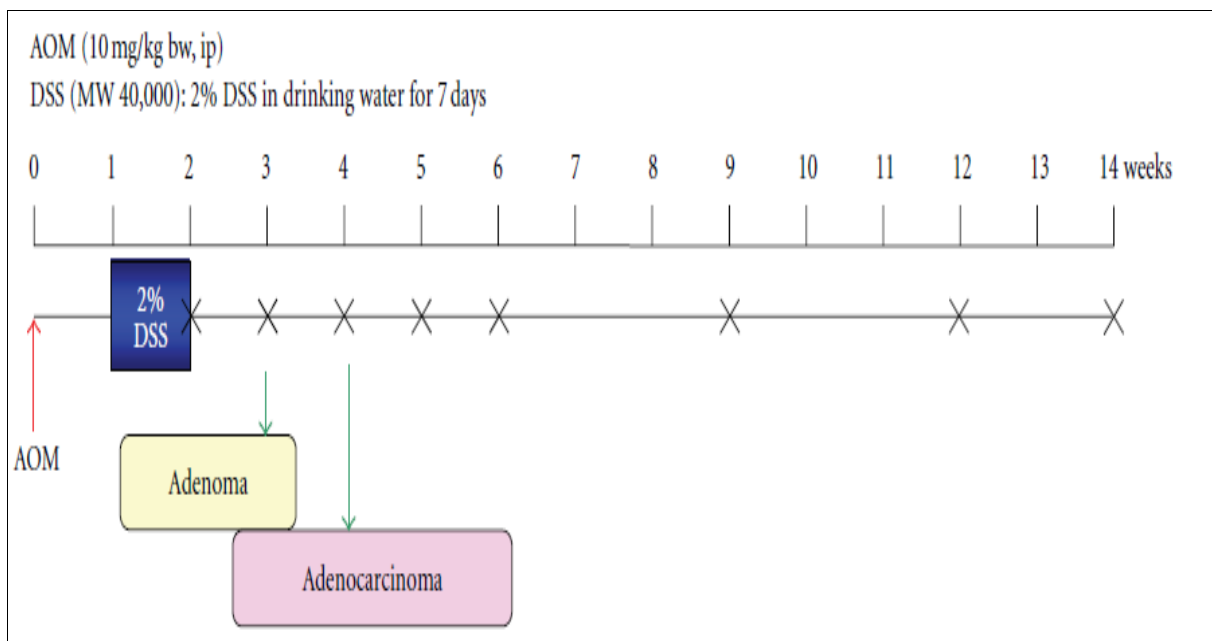
plusieurs ligands dont l'EGF et le TGF- $\alpha$  principalement, mais aussi l'amphiréguline, l'épiréguline, la  $\beta$ -celluline, le facteur de croissance lié à l'héparine ou HB-EGF (Heparin-Binding EpidermalGrowth Factor) et les neurégulines. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne l'activation de ce dernier par phosphorylation au niveau des résidus tyrosines spécifiques situés sur son domaine intracellulaire. L'activation de l'EGFR, suite à la fixation du ligand, est responsable de l'activation des voies de signalisation intracellulaires qui sont essentiellement la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, toutes deux impliquées dans la prolifération, la migration, l'adhésion et la différenciation cellulaire, ainsi que dans la résistance à l'apoptose et l'angiogénèse (**Figure 52**). (Lièver& Laurent- Puig, 2010).



**Figure 52** : Activation du récepteur de l'EGF et des voies de signalisation intracellulaire

Les résultats des modèles de rongeurs traités par l'AOM aident à identifier les éventuelles approches préventives du cancer du côlon humain (Corpet, 2003). Les tumeurs induites par l'AOM partagent de nombreuses caractéristiques histopathologiques avec des tumeurs humaines. Tout comme les tumeurs humaines, elles sont souvent mutées sur les gènes K-ras et bêta-caténine (Dashwood et al, 1998), et montrent une instabilité des microsatellites, mais contrairement aux tumeurs humaines, elles sont rarement mutés au gène Apc (15%), ne sont jamais mutés à la P53 et ont une faible tendance à se métastaser (DeFilippo et al, 1998).

Selon (Tanaka, 2011), et en utilisant le même protocole d'induction de la tumeur colique par la combinaison de l'AOM (injection en ip de 10mg/Kg) et du DSS (2% dans l'eau potable), l'observation sur le temps a révélé que l'adénome colorectal et l'adénocarcinome se sont développés respectivement 3 et 4 semaines après l'administration de l'AOM et le nombre a augmenté de manière dépendant du temps pendant la période de suivi jusqu'à 14 semaines (**Figure 53**).

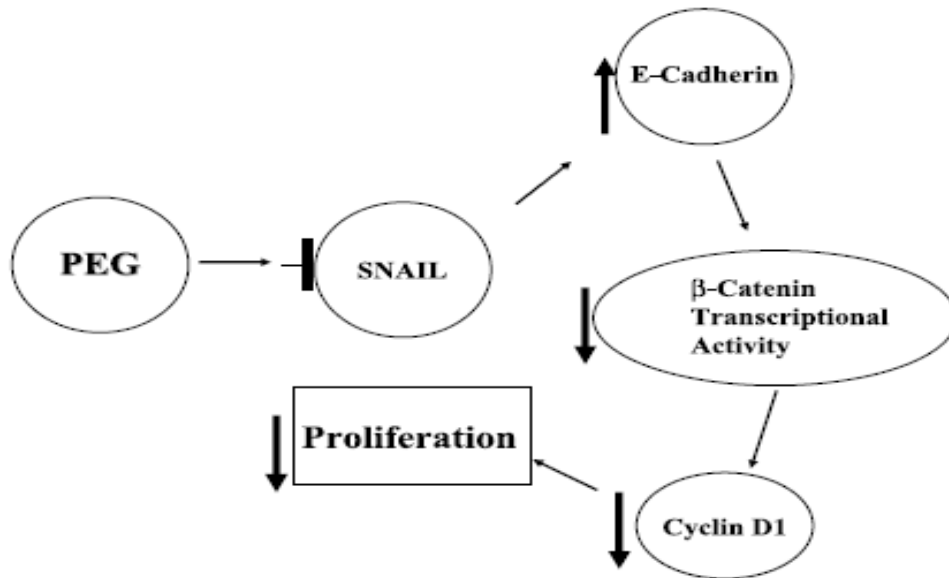


**Figure 53** : développement de la carcinogénèse et développement de la tumeur colorectale associée à l'inflammation et induite par l'AOM/DSS.

L'observation microscopique des colons des groupes ayant reçu un traitement, après l'induction de la tumeur, montre que la tumeur induite par l'AOM/DSS a régressé par le traitement à base de bave et d'homogénat.

Les **figures 47.c et 49** présentent la muqueuse colique du groupe qui a reçu le PEG (Polyéthylène glycol) à 5% dans de l'eau potable pendant une semaine. Ces figures montrent la présence de glandes d'un aspect normal (flèche jaune) avec quelques glandes dilatées en guise de séquelles (flèche rouge), ce qui confirme l'effet antitumoral exercé par le PEG.

Le PEG est connu non seulement par son pouvoir protecteur de la muqueuse colique (d'où son utilisation en préparation pour la coloscopie), mais aussi par sa suppression des premiers stades de la carcinogenèse du côlon par ses effets antiprolifératifs. Du point de vue de la signalisation, le PEG rétrograde négativement le gène  $\beta$ -catenin appartenant à la famille des gènes SNAIL (Roy et al, 2006). Les gènes SNAIL peuvent jouer un rôle dans la récurrence du cancer du sein en régulant à la baisse de l'E-cadhérine et en induisant une transition épithéliale vers le mésenchyme (Davidson et Sukumar, 2005). Le processus de l'EMT (epithelial to mesenchymal transition) est également noté comme un processus important et remarquable dans la croissance tumorale, par l'invasion et la métastase des cellules tumorales due à la répression des molécules d'adhésion E-cadhérine. Grâce à des modèles knockout, une étude a montré l'importance du SNAIL dans la croissance des cellules cancéreuses du sein (Olmeda et al, 2007). L'inhibition de ce gène conduit à une augmentation de l'E-cadhérine de la membrane plasmique. Pour une tumeur, l'augmentation de l'expression de l'E-cadhérine au niveau de la membrane plasmique limite l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine, entraînant une diminution de la cycline D1 et donc de la prolifération (**figure 54**) (Roy et al, 2006).



**Figure 54** : mécanisme moléculaire par lequel le PEG supprime l'hyperprolifération de la muqueuse colique.

L'observation des coupes histologiques des groupes HMG et Bave (**figures 47.d, 50 et 47.e, 51**) montre les mêmes résultats observés au niveau des coupes histologique du colon traité par le PEG. On remarque, sur les coupes des deux extraits, la présence de glandes de Lieberkuhn d'une forme normale (aspect de rose) avec des contours cellulaires bien définis (flèches jaunes). On remarque aussi la présence de quelques glandes dilatées avec un fond clair (flèches rouges), ces glandes résultent de la tumeur précédemment induite par l'AOM/DSS.

Ces observations indiquent que les deux extraits de l'escargot *Helix aspersa* (l'homogénat et la bave), ont un effet antiprolifératif.

L'effet antitumoral de l'homogénat peut se rapprocher de celui de l'extrait aqueux (puisque ce dernier est préparé à base du lyophilisat de l'homogénat). Une étude menée précédemment par notre équipe, s'est intéressée au mode d'action de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa* et le type de la mort cellulaire qu'il pourrait induire (El Ouar et Naimi, 2014).

Cette étude a montré que l'extrait aqueux possède un effet antitumoral sur une lignée de cellules mammaire tumorale Hs578T. Ce résultat a été confirmé dans notre travail par le test de cytotoxicité sur la lignée des cellules mammaires MCF7 où on a observé une inhibition de 56,39% de la croissance des cellules tumorales.

L'étude de (El Ouar et Naimi, 2014) a porté sur l'effet de l'extrait aqueux sur le TNF $\alpha$ , le NF- $\kappa$ B, la Bcl2 et les gènes suppresseurs de tumeur : P53 et PTEN. Elle a indiqué que l'extrait aqueux provoque une nécroptose modulée par le TNF $\alpha$  dans la lignée Hs578T. l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans ce processus a montré que l'extrait aqueux stimule l'expression du TNF $\alpha$  mais inhibe celle du facteur NF- $\kappa$ B. Il réduit l'expression du gène de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et les gènes suppresseurs des tumeurs P53 et PTEN. El Ouar et Naimi 2014 ont émis une hypothèse disant que la molécule bioactive majeure est une lectine, néanmoins les propriétés anti-oxydantes résultent de la présence d'un autre anti-oxydant comme les polyphénols. (Kouachi et Naimi 2016, 2017)

## V- CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet antiprolifératif de 3 extraits de l'escargot *Helix aspersa* : l'extrait aqueux (*in vitro*), l'homogénat et la bave (*in vivo*).

Les trois extraits ont montré qu'ils possèdent un effet antitumoral, ceci a été prouvé par un test de cytotoxicité *in vitro* sur une lignée de cellules tumorale mammaires MCF7 et par une étude *in vivo* sur un modèle murin de tumeur colique induite par une combinaison de l'AOM et du DSS chez *Mus musculus*

L'extrait aqueux et donc l'homogénat induisent une nécroptose, tandis que le mode d'action de la bave reste encore mal connu. De ce fait, l'origine de la nécroptose de l'extrait aqueux et l'homogénat ainsi que la mise en évidence du mode d'action de la bave restent à confirmer.

Une étude en cours favorise à priori l'hypothèse émise par El Ouar et Naimi 2014, qui suggère l'implication des lectines dans la nécroptose, attribuant ainsi l'effet antitumoral de l'extrait aqueux et de l'homogénat à la fraction protéique beaucoup plus qu'aux polyphénols. Des recherches dans ce sens sont entreprises et restent à être achevées.

**CONCLUSION  
GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GNRALE ET PERSPECTIVES

Nos expérimentations ont été menées dans le but d'étudier les effets immunomodulateur, anti-inflammatoire et antiprolifératif de la bave, l'homogénat et l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*.

Une caractérisation des extraits a été effectuée puis une évaluation de la toxicité de la bave ainsi que l'homogénat. Cette étude a révélé que nos extraits ne sont pas toxiques, aucun décès n'a été noté parmi les animaux traités ; bien au contraire, on a remarqué une prise de poids ainsi qu'une stabilité de la température. Cela nous a permis de choisir une concentration de 20 ml/Kg de bave et 5 mg/Kg d'homogénat. L'extrait aqueux a été administré à un volume égal à 300 µl/souris.

Après caractérisation des extraits et évaluations de leur toxicité, nous avons étudié l'effet immunomodulateur de l'extrait aqueux sur des souris *Mus musculus*. Cet extrait s'est avéré immunostimulant, il a amélioré l'activité phagocytaire des cellules immunitaires du système réticulo-endothélial. Ce résultat a été confirmé par un test de clairance du carbone suivi d'une observation des frottis sanguins.

L'activité immunostimulante de l'escargot *Helix aspersa* nous a ouvert d'autres horizons. Cette immunostimulation nous a incité à étudier et mettre en évidence d'autres effets thérapeutiques. Dans ce contexte, deux modèles de maladies expérimentales chimio induites ont été réalisées sur deux modèles animaux expérimentaux : la colite chez des rats *Wistar* et le cancer colorectal chez des souris *Mus musculus*.

La colite expérimentale a été induite chimiquement chez des rats *Wistar* par une injection transrectale de l'acide acétique. Cette inflammation aigüe a été traitée par l'homogénat et la bave de l'escargot *Helix aspersa*. L'impact du traitement par les extraits a été comparé à un traitement par un anti-inflammatoire commercialisé : le 5-ASA.

Les extraits ont montré un effet anti-inflammatoire et anti-oxydant. L'observation microscopique des coupes histologiques des colons a révélé des dommages dans les foyers de crypte des glandes de Lieberkuhn. Les FC présentent une apparence aberrante, mais sans hyperplasie ni dysplasie. Les extraits de l'escargot *Helix aspersa* peuvent contenir des molécules bioactives avec des effets anti-inflammatoires, immunostimulants et antioxydants.

Une inflammation chronique non traitée peut facilement évoluer vers une tumeur, c'est pour ça qu'il a été intéressant de vérifier l'effet antitumoral des extraits de l'escargot *Helix aspersa*.

Cette étude a été réalisée *in vitro* sur une culture de cellules tumorales mammaires MCF7 et *in vivo* sur une tumeur colorectale expérimentale induite par la combinaison d'un cancérigène l'AOM et d'un inducteur de colite le DSS.

L'étude *in vitro* de l'effet antitumoral de l'extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa* a montré une inhibition de 56,39% de la croissance des cellules tumorales mammaire MCF7.

L'effet antitumoral de l'extrait aqueux mis en évidence par une étude *in vitro* nous a encouragé à réaliser une étude et une recherche de l'effet antitumoral de la bave ainsi que l'homogénat de l'escargot *in vivo* chez des souris *Mus musculus*.

Cette étude a été effectuée par l'induction chimique d'un cancer expérimental colorectal. Cette induction a été réalisée par une injection intrapéritonéale d'un cancérigène chimique, l'AOM (azoxyméthane) puis l'administration d'un inducteur de colite dans de l'eau potable, le DSS (dextran sodium sulfate).

L'observation microscopique des colons du groupe non traité a confirmé l'action inductrice de tumeur colique de la combinaison chimique AOM/DSS. On a pu observer clairement l'installation et l'évolution de la tumeur en commençant par la transformation des glandes de Lieberkuhn normale (aspect de rose) en glandes dilatés, présentant un fond clair, puis hypertrophiées, perdant ainsi la forme arrondie, puis une destruction totale des glande et une prolifération anarchique des cellule.

L'observation microscopique des colons des souris traitées par la bave et l'homogénat a montré que ces extraits ont réparé l'architecture de la muqueuse colique après installation de la tumeur. Cette réparation a été comparée à l'action du PEG (polyéthylène glycol) qui est un protecteur de la muqueuse colique possédant aussi un effet antitumoral.

Les extraits de l'escargot *Helix aspersa* ont fait preuve d'un effet antitumoral *in vivo* et *in vitro*.



L'escargot *Helix aspersa* possède plusieurs effets thérapeutiques. Il serait donc intéressant de l'introduire dans l'alimentation quotidienne en guise de prévention ou en complément alimentaire dans un but curatif.


Après la mise en évidence de ces effets thérapeutiques, nous envisageons de purifier et extraire les molécules bioactives responsables de ces effets et étudier le mode d'action exact à l'échelle moléculaire.

Aussi, il est envisagé d'étudier la répercussion de l'induction chimique de l'inflammation et la tumeur ainsi que l'impact du traitement par les extraits de l'escargot d'*Helix aspersa* sur les organes lymphoïdes tels que le thymus, la rate, le foie et les reins.

# **ANNEXES**

**ANNEXE 1 : Analyse microbiologique des escargots *Helix aspersa***

N° Dossier :627



**INMV**  
Institut National de la Médecine Vétérinaire  
Laboratoire Central Vétérinaire

**INSTITUT NATIONAL DE LA MEDECINE VETERINAIRE**

**Laboratoire Vétérinaire Régional de Constantine**


**RAPPORT D'ESSAI**

N°Dossier: 627      Date de réception: 01-04-2012  
Référence :283/LVRC/2012      Date de l'échantillonnage: 01-04-2012

<b>Demandeur</b>	
Nom: METARI AVN: 0091230 Tel/Fax:	Prénom:HOCINE Fonction :VETERINAIRE Adresse:BHC ZEGHAIA / MILA
<b>Propriétaire/Importateur/exportateur</b>	
Nom: SOUYAD Raison Sociale:Privé Tel/Fax:	Prénom:SMAIN N° Agrément: / Adresse: ZEGHAIA MILA
<b>Fournisseur</b>	
Fournisseur:/ Adresse :/	Code Usine :/
<b>Prélèvement et échantillon</b>	
Nombre d'échantillons :1 Date de départ : Pays : Commune :ZEGHAIA	Origine : Contrôle local Date d'arrivée : Wilaya : MILA Destination:

Liste des échantillons

N°	Libellé	Produit	Marque	Conditionnement	Date Fabrication	Date Péréemption	Date Congélation	Condition Conservation
1	Escargot	Mollusques réfrigérés	/	Sachets				Température ambiante



Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du laboratoire  
@Mail: lvr\_constantine@inmv.edu.dz    N°Téléphone:031801153 N°Fax:031801153  
Macro Data Word Copyright      03/04/2012

1/2

N° Dossier :627

**RESULTAT D'ANALYSE**

Le résultat du bulletin d'analyse ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse Norme EN 17025

**Microbiologie Alimentaire**

N°Echantillon: 1 Lots; Libellé: Escargot; Famille: Poissons et produits de la pêche ; Produit: Mollusques réfrigérés

Germe/Paramètre	Norme Min	Résultat1	Interprétation
Germes aérobies à 30°C (UFC)	1000000	7000	Qualité satisfaisante
Salmonella (UFC)	0	0	Qualité satisfaisante
Clostridium sulfito-réducteurs à 46°C (UFC)	2	0	Qualité satisfaisante
Coliformes fécaux (UFC)	10	0	Qualité satisfaisante
Staphylococcus aureus (UFC)	100	0	Qualité satisfaisante

مدير المختبر البيطري الجهوي  
 مختبر  
 طبيبي بيطري مختص

Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du laboratoire  
 @Mail: lvr\_constantine@inmv.edu.dz N°Téléphone:031801153 N°Fax:031801153  
 Macro Data Word Copyright 03/04/2012

**ANNEXE 2 : Estimation de la toxicité de la bave de l'escargot *Helix aspersa*****Tableau 9 : Poids (g) des animaux traités par 600 µl de bave (dose égale à 20 ml/Kg)**

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
37,4	35,9	37,9	37,1	35,8	36,8	36,9	38,3
38	37,8	37,5	37,3	36	37,8	36,9	38,6
38	37,7	37,6	38,2	36	36,1	37,8	38,4
37,6	37,5	38	38,3	36,4	36,4	38	37,7
38,5	36,7	37,7	38,8	36,1	36,6	36,4	37,9
38,2	38,6	38	38,7	35,6	37,6	37,4	38,8
37,8	38,3	37,6	37	36,9	37	38,1	38
37,6	37,2	37,8	38,7	35,5	37	37,5	38
38,3	37,9	38,3	33,1	37,6	36,4	37,4	38,6
37,9	38,2	38,2	38,8	37,2	36,7	36,9	38,4

**Tableau 10 : Poids (g) des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6 ml/Kg)**

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
38,4	35,4	37	38,1	37	38	37,8	38,9
38,2	34,5	37,6	37	37,6	36,4	37,1	38,8
38,6	37,7	36,8	37,1	37,7	37,1	38,2	38
38,1	37	37,6	37,2	36,5	37,3	38,1	37,5
25	37,4	37,7	38,2	37,1	36,8	38,4	37,5
38	37,3	37,8	37,6	35,7	37,4	37,7	38,1
38,2	37,4	37,5	37,1	37,2	37	37,8	38,3
38,3	37	37	37,9	36	36,3	38,2	38,5
38,3	37,7	38,3	37,6	38	36,6	37,5	38,9
38,2	37,8	37,6	37,5	37	37	37,9	38,2

**Tableau 11: Poids (g) des animaux traités par 1000 µl de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg)**

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
37,9	37,1	38,7	37,1	36,3	37,5	36,9	38,2
38	37,5	38,7	37,6	36,7	37,7	37,8	38
38	37,6	38,7	37,8	36,8	38	38,4	37,7
37,6	36,2	36	38,6	37,5	37,7	38,2	38,5
37,8	37,6	38	38,3	37,1	37,6	38,4	37,9
38,3	37,5	38,9	38,3	36,4	37,6	38,4	39,1
38,3	37,4	38,7	38,2	36,1	37	38	37,6
38,3	37,6	37,5	38,5	37,7	37,9	38,1	38,3
38	36,9	37,8	38,4	37,4	37,5	37,9	38,1
38,3	37,3	38,7	38,8	37,3	37,2	38,2	38,6

**Tableau 12:** Températures (°C) des animaux traités par 600 µl de bave (dose égale à 20 ml/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
25,1	18,2	27,9	20	27,6	26	26,6	24,9
25,7	24,6	23,8	23,5	23,3	25,6	18,6	28,9
25	23,2	27,4	27,8	29,3	25,7	26,7	28,3
21,7	24,3	28,3	27,4	27,4	25,3	25,4	26,7
26,5	22	21,2	28	26,8	19,4	24,5	27,5
27,3	23,8	29,1	27,2	27,8	27,6	20,8	27,7
23,8	22,1	27,7	29,1	20,7	23,7	24,8	26,1
19,5	20,1	25,7	27,3	27,2	27	23,1	20,7
23,5	25,5	26,8	26,6	25,2	21,6	25,9	27,2
26,2	24,1	28,3	25,4	28,1	26,4	24,8	22,3

**Tableau 13:** Températures (°C) des animaux traités par 800 µl de bave (dose égale à 26,6 ml/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
28,9	23	18,5	22	22,8	25,9	26,8	29,5
26,6	20,2	25,5	22,1	22	26,2	23,9	30,3
22,7	26,6	22,1	21,9	24,5	28,8	26,9	23,2
25,3	19,7	22,2	23,6	21,4	28,2	26,6	27,2
29,9	24,2	23,1	26	22,8	22,9	28,3	26
25,7	23,4	24,1	25,6	21,2	26,2	21,3	24,7
25,6	23,5	25,5	23,9	25,5	25,7	25,2	24,1
23,7	21,7	22,3	23	17,1	24,7	28,9	28,5
21,4	26,1	23,1	18,3	21	20,4	26,4	25,4
26,9	23,8	24	22,7	23,6	27	25,3	26,8

**Tableau 14:** Températures (°C) des animaux traités par 1000 µl de bave (dose égale à 33,3 ml/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
25,9	25,2	28,1	26	27,6	25,4	25,8	25,2
23,8	22,8	25,6	26,1	25,4	25,6	28,6	29
23,1	24,1	25,4	25,9	25,1	28,5	26	24,1
21,5	21	26	26,2	28,9	28,4	25,2	26,7
25,5	24,3	28	24,3	25,6	25,4	27,6	29
26,2	20,7	29	28,2	25,5	25,2	24,8	24,7
22,9	22,2	28,3	28	28,6	23,7	23,4	28
23,7	21,8	25,2	28,2	25,8	24,6	28,3	25,6
23,2	21,8	25,2	25,4	24	27,6	25,8	23
21,3	22	23,9	24,3	25,6	25,3	25,4	24,2

**ANNEXE 3** : Estimation de la toxicité del'homogénat de l'escargot *Helix aspersa***Tableau 15:** Poids (g) des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
34,2	35,5	34,7	38	37,5	36,1	38,7	36,3
33,9	34,4	36,9	34,8	38,1	35,8	37,3	38,7
34,1	34,2	36,5	38,6	38	38,6	38,8	38,5
33,9	34,2	36,7	38,2	38,5	37,9	39	39,1
34,8	34,2	36,6	38,3	38,8	38,9	38,5	38,7
34,2	35,3	37,6	38,3	38,8	37	39,3	38,1
33,9	34,9	35,3	38	37,7	37,9	38,9	38,4
34	34,7	36,7	38	37,6	38,3	38,8	38,8
34	34,8	38,2	37,7	38,6	39,2	38,9	38,9
34	34,4	36,9	38	38,2	37,3	38,2	38,2

**Tableau 16:** Poids (g) des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
32,8	34,9	34,4	37,3	38,3	38,2	38	38,4
34,2	33,6	34,1	37,5	38,3	38,6	39	38,3
34	34,2	32	36,4	38,8	36,5	38,7	37,3
34,2	34,6	36,3	37,8	38,1	38,8	38,2	37,6
34,2	34,6	37,9	38,6	37,9	36,1	37,4	37,9
33,9	34,4	36,1	37,9	38,2	38,5	37,1	38,3
35	35,4	35,1	37,5	37,4	38	37	38,5
34,3	33,8	37,3	38,5	37,5	37,7	38,6	38,9
33,4	34,7	37,2	37,3	36,9	38,5	37,6	38,4

**Tableau 17:** Poids (g) des animaux traités par 160 mg d'homogénat (dose égale à 5 g/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
33,5	33,3	35,7	37,1	38,5	38	37,7	38,4
34,2	33,3	35,5	37,3	37,5	38	37,4	38,6
34,3	34,4	37	38,1	36,4	35,9	38,5	38,2
34	34,7	35	35,7	36,3	37,5	38,9	37,9
34,2	34	36	36,1	38	36,6	39	38,7
34,1	35,7	37,2	38	37,6	38	38,9	38,1
33,6	34,5	37,2	37,1	38,7	38,2	39,3	38,3
33,5	34,6	37,5	38,3	38,4	38,6	39,4	37,8
34	37,1	37,7	37,9	38,5	37,4	38,9	38,3
33,9	34	37	38,2	38,3	38,3	38,9	38,1

**Tableau 18:** Températures (°C) des animaux traités par 120 mg d'homogénat (dose égale à 4 g/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
25	24,8	25	24	25,5	26,9	26,4	25,9
26	26,3	26,2	26,8	25,7	25,2	25,7	26,6
26,2	25,2	27	25,9	25,7	23,6	27,6	26
26	28	25,8	27,8	24,6	25,9	27,3	26
27	26	27,7	25,5	27,8	26,4	28,7	26,9
25,3	25,1	27,6	25,8	27,2	25	23,1	26
25,9	25,6	26	25,2	25,9	24	24,5	25
25,3	25,6	23,3	24,8	23	28,3	25,9	25,1
26,4	27	25	27,9	28,3	28,6	24,9	27

**Tableau 19:** Températures (°C) des animaux traités par 140 mg d'homogénat (dose égale à 4,5 g/Kg)

1er jour	3eme jour	5eme jour	7eme jour	9eme jour	11eme jour	13eme jour	15eme jour
26,5	27,4	29,4	27,2	24,9	27	23,7	29,9
24,3	26,2	28,4	26	27,3	27,3	26,8	23,6
29,4	26,2	28,5	29,2	27,3	26,8	26,6	25,5
26,2	28,4	27,3	28,6	29,5	28,4	25,5	24,9
25,5	26,4	25,8	27,7	26,7	26,6	23,2	26,6
29,8	26,6	24,4	27,3	29,2	28,6	25,6	28,4
26,8	26,5	27,3	24,3	25,7	23,8	22,3	26,7
26,2	24,8	27,1	26,9	26,2	25	25,1	25,5
24,6	23,4	26,7	26,8	27,9	25,5	21,7	26,4

**Tableau 20:** Températures (°C) des animaux traités par 160 mg d'homogénat (dose égale à 5 g/Kg)

18-mars	22-mars	24-mars	25-mars	26-mars	27-mars	30-mars	31-mars
23,8	19,5	23,4	23,7	22,4	23,7	27,1	23,8
23,4	20,3	25,9	22,9	23,1	23,1	21,4	24,1
21,9	20	26,2	26,6	25,5	22,1	25,9	25,5
23,8	22,2	27	23,8	23,1	23	23,7	24,7
24	22,3	25,2	23,8	22,8	22,1	26	23,8
23,4	21,9	28,1	24,7	21,6	25	24,2	27,3
23,4	23	25	24,3	24,1	23,5	24,1	23,2
22,6	21,2	27	23,3	22,5	26,1	23,8	20,7
23,7	21,3	26,2	24,2	22,4	22,9	23,2	25,8
23	22,1	26	22,4	21,7	20,7	24	24,1



**ANNEXE 4 : Effet Immunomodulateur (Activité Phagocytaire)****Tableau 21:** Activité phagocytaire du lot contrôle (300 µl NaCl 9‰)

Poids corporel (g)	poids du Foie (g)	poids de la Rate (g)	DO1	DO2	K	$\alpha$	T <sub>1/2</sub>
32,1	1,65	0,1	0,159	0,271	0,038161	6,583445	18,16004
29,7	1,46	0,1	0,091	0,256	0,037403	6,836513	18,52803
32	1,64	0,14	0,143	0,125	0,079861	8,462954	8,677617
28	1,65	0,19	2,68	1,173	0,092443	7,758919	7,496498
28,2	1,39	0,17	0,068	0,054	0,109419	9,784897	6,333435
30,1	1,2	0,07	0,088	0,105	0,085092	11,06347	8,144148

**Tableau 22:** Activité phagocytaire du lot traité par 50 mg/Kg d'extrait aqueux

Poids corporel (g)	poids du Foie (g)	poids de la Rate (g)	DO1	DO2	K	$\alpha$	T <sub>1/2</sub>
28,2	1,54	0,15	0,029	0,125	0,074595	7,771553	9,290178
29,4	1,33	0,18	0,015	0,063	0,102231	10,42028	6,778736
31,4	1,47	0,18	0,02	0,016	0,142435	11,2494	4,865369
30,1	1,58	0,11	0,032	0,034	0,122771	9,523022	5,644668
24,3	1,33	0,1	0,13	0,048	0,115264	8,940399	6,012264
26,3	1,11	0,06	0,139	0,091	0,093055	10,76409	7,447233

**Tableau 23:** Activité phagocytaire du lot traité par 100 mg/Kg d'extrait aqueux

Poids corporel (g)	poids du Foie (g)	poids de la Rate (g)	DO1	DO2	K	$\alpha$	T <sub>1/2</sub>
29	1,53	0,13	0,065	0,051	0,024256	5,524366	28,57006
33,7	1,97	0,17	0,097	0,025	0,135584	8,875522	5,111241
28,7	1,51	0,22	0,083	0,024	0,124079	9,589634	5,585166
21,4	1,01	0,13	0,084	0,051	0,049899	7,848377	13,88802
30,9	1,93	0,58	0,32	0,225	0,035222	5,43827	19,67517
28,2	1,81	0,38	0,083	0,048	0,054764	6,060859	12,65431

**Tableau 24:** Activité phagocytaire du lot traité par 250 mg/Kg d'extrait aqueux

Poids corporel (g)	poids du Foie (g)	poids de la Rate (g)	DO1	DO2	K	$\alpha$	T <sub>1/2</sub>
29,4	1,56	0,13	0,07	0,057	0,020544	5,197239	33,73182
29,1	1,55	0,15	0,084	0,072	0,015415	4,709765	44,95601
31,2	1,62	0,14	0,089	0,037	0,087772	8,62125	7,89547
20,4	1,05	0,13	0,036	0,018	0,069315	8,034255	9,997877
24	1,17	0,14	0,033	0,013	0,093156	9,362303	7,439149
29,5	1,54	0,11	0,093	0,053	0,056231	7,380957	12,32422

**ANNEXE 5 : Effet anti-inflammatoire****Tableau 25:** Paramètres biochimiques des groupes traités par l'homogénat

Paramètres	Contrôle	*AA	**ASA/AA	**HMG/AA	*HMG
<b>TGO</b> (UI/L)	148,16 ± 12,22	178± 16,87 (P<0,008)	146,83±13,16 (P<0,0009)	146,83± 13,16 (NS)	125,66± 19,66 (p<0,02)
<b>TGP</b> (UI/L)	145,83 ± 13,77	173,66±18,24 (P<0,002)	173,5 ± 16 (P<0,002)	144,16± 13,16 (NS)	121,5 ± 19,83 (P<0,002)
<b>γGT</b> (U/L)	6 ± 0,88	6,66 ± 0,66 (P<0,02)	5,83 ± 0,66 (P<0,02)	7,66 ± 0,88 (P<0,01)	4,5 ± 0,44 (NS)
<b>CRP</b> (mg/l)	1,4 ± 0,18	6,68 ± 0,74 (P<0,002)	3,95 ± 0,40 (NS)	3,58 ± 0,42 (NS)	1,82 ± 0,33 (NS)
<b>MDA</b> (μM/g)	1,60±0,67	2,48±0,56 (P<0,002)	2,12±0,65 (NS)	2,02±0,29 (NS)	1,7±0,34 (NS)
<b>Protéines Totales Plasmatiques</b> (g/ml)	3,65 ± 0,50	4,46 ± 0,52 (P<0,002)	2,82 ± 0,55 (NS)	4,43 ± 0,54 (NS)	4,07 ± 0,51 (P<0,01)
<b>Protéines Totales hépatiques</b> (g/ml)	2,52 ± 0,27	4,45 ± 0,49 (P<0,002)	2,57 ± 0,54 (P<0,003)	2,01 ± 0,22 (P<0,0002)	2,57 ± 0,22 (P<0,003)

**Tableau 26:** paramètres biochimiques des groupes traités par la bave.

Paramètres	Contrôle	*AA	**ASA/AA	**Bave/AA	*Bave
<b>TGO</b> (UI/L)	148,16±12,22	178±16,87 (NS)	146,83±13,17 (NS)	161±16,22 (NS)	160,33±12,67 (NS)
<b>TGP</b> (UI/L)	145,83±13,78	173,67±18,24 (NS)	173,5±17,63 (NS)	159,33±15,56 (NS)	156,5±11,11 (NS)
<b>γGT</b> (U/L)	6±0,89	6,67±0,67 (NS)	5,83±0,67 (NS)	2,83±0,67 (NS)	3,3±0,47 (NS)
<b>CRP</b> (mg/l)	1,407±0,19	6,68±0,74 (P<0,016)	3,95±0,41 (NS)	2,22±0,57 (P<0,016)	2,18±0,4 (P<0,015)
<b>MDA</b> (μM/g)	3,66±0,51	4,46±0,53 (NS)	2,83±0,55 (NS)	4,47±0,45 (NS)	3,78±0,39 (NS)
<b>Protéines Totales Plasmatiques</b> (g/ml)	2,52±0,27	4,45±0,49 (P<0,007)	2,58±0,55 (P<0,0002)	4,65±0,49 (P<0,003)	3,05±0,32 (P<0,007)
<b>Protéines Totales hépatiques</b> (g/ml)	1,61±0,68	2,49±0,57 (P<0,002)	2,12±0,65 (P<0,021)	1,21±0,65 (P<0,021)	1,80±0,65 (NS)

**ANNEXE 6 : Effet antitumoral****Tableau 27:** taux de la protéine C réactive (CRP)

<b>lot C</b>	5,24	6,17	4,98	6,02	8,01	7,79	6,67
<b>lot AOM</b>	11,02	16,2	13,1	15	9,26	7,89	14,3
<b>lot PEG</b>	6,25	4,36	5,24	5,78	8,95	6,078	8,1
<b>lot HMG</b>	3,3	6,3	5,9	5,7	6,04	7,4	8,15
<b>lot bave</b>	5,8	7,14	6,8	5,36	7,01	6,49	8,07

**Tableau 28:** pourcentage des cellules viables après traitement par différentes dilutions de l'extrait aqueux (test MTT)

extrait brut non dilué	dilution 10 <sup>-1</sup>		dilution 10 <sup>-2</sup>		dilution 10 <sup>-3</sup>		dilution 10 <sup>-4</sup>		dilution 10 <sup>-5</sup>	
	38,7819947	56,7213022	116,124934	79,2284282	64,7232641	85,8474144	90,3050989	90,3951532	116,067042	77,6766773
31,9687073	65,6109416	85,9053064	94,466891	86,0082255	123,232786	134,296592	96,763274	154,095659	88,2433406	4,13478128
45,2052084	79,4985909	93,3862402	72,6480367	90,5559643	56,3675178	116,948287	153,761171	121,463864	117,022112	4,1607862
61,6663188	66,9102955	72,9953887	57,6990339	67,3348369	84,3550871	71,901873	67,1097013	87,9958511	102,936117	5,31367071
43,9222993	58,2972513	83,1715171	94,756351	94,9171622	99,4841983	57,5575201	73,0983079	123,625165	123,809394	4,10877637
43,4195376	51,7361572	69,5090034	88,471852	91,289263	85,0176289	102,346636	98,1912768	121,61181	100,838387	4,06543485
45,7253066	65,0641837	76,1730167	90,2279096	127,639011	112,735036	125,168952	114,040822	93,5727811	93,5223381	5,23565596
38,0711937	78,1220476	72,5708474	85,3714134	116,710287	108,817676	81,2610809	95,6761907	62,7034763	105,363242	4,09143976

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Adeyemo, O.K. Agbede, S.A. Magaji, A.A. (2002). Clearance of colloidal carbon from the blood of Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Vet. Archive*, 72, 2, 109-118.
- Agarwal, S.S. & Singh V.K. (1999). Immunomodulators: A Review of Studies on Indian. *Medicinal Plants and Synthetic Peptides, Part I: Medicinal Plants.PINSA*; 65,3-4, 179-204.
- Auberval, N. Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Université de Strasbourg, école doctorale des sciences de la vie et de la santé, 54.
- Avagnina, G., (2009). *Héliciculture*. Cherasco. Institut International d'Héliciculture de Cherasco. Italie : Grafiche Fassicomo. 21-22.

## B

- Babior, B.M. (1999). NADPH: An update. *Blood*; 93, 1464-1476.
- Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. M.*; 109, 33-44.
- Balkwill, F and Mantovani, A., (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet*. 357 (9255): 539–545.
- Barros F.B., Varela S.A.M., Pereira H.M., Vincente L. (2012). Medicinal use of fauna by a traditional community in the Brazilian Amazonia. *Journal of Ethnobiology & Ethnomedicine*. 8 (37): 1-20.
- Bastid, J.M., Béné, M.C., Bézian, J, Pillot, J. (1990). *Immunologie Clinique*. McGRAW HILL Publishing Company, Paris – France, 2.
- Bastide, J.M. Béné, M.C., Bézian, J. Pillot J. (1990). *Immunologie Clinique*. McGRAW HILL Publishing Company, Paris – France, 4.
- Belkaid, Y., Hand, T.W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.*, 27, 157,1, 121-41.
- Benacerraf, B., Sebastyen M, Cooper N.S. (1959). The clearance of antigen-antibody complexes from the blood by the reticulo-endothelial system. *J. Immunol*, 82, 131-137.

- Benitez G. (2011). Animals used for medicinal and magico-religious purposes in western Granada Province, Andalusia (Spain). *Journal of Ethnopharmacology*. 137: 1113-1123.
- Benmebarek, A., Zerizer, S., Lekhal, H., Kabouche, Z. (2014). Biphasic dose response effect of *stachysocymastrumon* the reticuloendothelial system phagocytic activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 6, 534-537.
- Benmebarek, A., Zerizer, S., Laggoune, S., Kabouche, Z. (2013). Immunostimulatory activity of *Stachysmialheside* Noé. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology. Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*; 9, 1, 2.
- Benzair, A. (2005). Immunologie : les connaissances de base. *Office des publications universitaires*, 10.
- Biozzi, G., Benacerraf, B., Halpern, B.N. (1953). Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system. II: a study of the kinetics of the granuloplectic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity. *Br J Exp Pathol*, 34, 441- 457.
- Bird, R.P. (1987). *Cancer Lett*, 37, 2, 147-151.
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G., (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem*, 5, 484-489.
- Bonnemain B., (2003). Hélices et médicaments: l'escargot au service de la santé depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours. *Rev. Hist. Pharm.* 338: 211-218.
- Bonnemain B., (2005). Helix and drugs: Snails for western health care from antiquity to the present. *eCAM*. 2(1): 25-28.
- Borgdan, C., Rollingshof, M., Diefenbach, A., (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin in Immuno*, 12, 1, 64.
- Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

## C

- Catalano, L., franco, I., DE Nobli, M., Leita, L., (1999). Polyphenols in olive mill wastewaters and their depuration plant effluents: A comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica*, 43, 5-6.
- Chabrol, E. & Charonnat, R., (1937). Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides : l'oleidémie. *Pres méd.*, 96, 1713-1714.
- Chase, R. (1986). Lessons from snail tentacles. *ChemSenses*, 11, 411–426
- Chevallier, H., (1977). La variabilité de l'escargot Petit-Gris (*Helix aspersa* Müller). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 3ème série, 448, *Zoologie*, 311.
- Christofferson, D.E. & Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 263-268.
- Cohen SJ, Cohen RB and Meropol NJ. (2005). Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer--more than skin deep. *J Clin Onco.* 23:5374-85.
- Corpet, D E., and Pierre, F. (2003). Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 391-400
- Cranga F.Y., (1993). L'escargot appartient-il à dieu ou au diable?. *L'Histoire*, 163: 72-73.
- Crehange, J. & Metais, P.,(1972). Etude comparative de quatre méthodes de dosage des lipides totaux sériques. *Bull. Soc. Pharm. Strasbourg*, 15, 185-197.

## D

- Das,S., L.Kanodia, L. (2012). *Academic Journals*, 5, 3,1 10-114.
- Dashwood, R. H., Suzui, M., Nakagama, H., Sugimura, T., and Nagao, M. (1998). High frequency of  $\beta$ -catenin (Cttnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res.*, 58: 1127–1129
- DeFilippo, C., Caderni, G., Bazzicalupo, M., Briani, C., Giannini, A., Fazi, M., and Dolara, P. (1998). Mutations of the Apc gene in experimental colorectal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Br. J. Cancer*, 77: 2148–2151.



- Devroede, G.J., Taylor W.F., Saue,r W.G., Jackman, R.J., Stickler, G.B. (1971). Cancer risk and life expectancy of children withulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.*, 285, 17-21.
- Drevon, B. & Schmit, J. M., (1964). La réaction sulfophosphovanillique dans l'étude des lipides sériques. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon.*, 8, 173-178.
- Drissi, A., Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J., Adlouni, A., (2006). Tocopherols and saponins derived from *Arganiaspinosa* exert, an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Investigation* , 24,6 , 588–92.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*, 82, 1, 47-95.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., (1956). Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350- 356.

## E

- Eaden, J A., Abrams, K R., and Mayberry, J F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis, *Gut.* 48 (4): 526–535.
- El Kebir, D. & Filep, J. G., modulation of neutrophils apoptosis and the resolution of inflammation through  $\beta 2$  Integrins. *Front Immunol.* 4: 60-75
- El Ouar, I. (2014). Recherche et évaluation des effets d'un extrait aqueux de gastéropode du genre *Helix (Helixaspersa)* sur quelques voies de bio signalisation dans la réponse immunitaire inflammatoire et anti tumorale. Immunologie/Bio-signalisation et Cancer, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences Naturelles et de la Vie. Université Mentouri, Constantine, Algérie , 13.
- EL Ouar, I., Atoui, H., Draa, I., Aggoune, C., Naimi, D. (2015). Protective Effect of *Helix aspersa* extract against Spleen and Liver Injuries Induced by N-Nitroso Methyl. Urea in Mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11, 113-116.
- El Ouar, I., Braicu, C., Naimi, D., Irimie, Berindan-Neagoe, I. (2013). Anti-tumor effect of aqueous extract from *Helix aspersa*. *Int J Pharm Bio Sci*, 4,3, (B) 1325 – 1332.
- Erukainure, O.L., Ajiboye, J. A., Adejobi, R. O., Okafor, O. Y., Adenekan, S. O. (2011). Protective effect of pineapple (*Ananascosmosus*) peels extract on alcohol–

induced oxidative stress in brain tissues of male albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1, 1, 5- 9.

- Escribano, M., et al. (2004). Aspirin inhibits endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and Flk-1 (vascular endothelial growth factor receptor-2) prior to rat colon tumour development. *Clin. Sci. (Lond)*. 106: 83-91

## **F**

- Filisetti-Cozzi, T.M.C. & Carpita, N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157-162.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C. & Carpita, N.C., (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197, 157- 162.
- Frenčík, M., Rovenský, J., Matha, V., Roux, H. (2005). Dictionnaire d'immunologie. Elsevier's SAS, 140-231.

## **G**

- García, M. P. O., Escolano, M. A.C., Segura, P.B., Melgares, M.L.G. (2006). *Science Direct*, 30, 5, 304-308.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. (2000). *Kuby Immunology*. 4th Ed. New York: W.H. Freeman.
- Gomot, A. (1998). Biochemical composition of *Helix Aspersa*: influence of genetic and Physiological factors. *J. Moll Stud.*, 64 : 173-181
- Gomot, A. (1998). Biochemical composition of *Helix Aspersa*: influence of genetic and Physiological factors. *J. Moll Stud.*, 64, 173-181
- Greenstein, A.J., Sachar, D.B., Smith, H., Pucillo, A., Papatestas, A.E., Kreel, I., Geller, S.A., Janowitz, H.D., Aufses, A.H.J. (1979). Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: factors determining risk. *Gastroenterology* 77, 290-294.
- Grisham, M.B. & Granger, D.N. (1998). *Dig Dis Sci*, 33, 3, 6S-15S.
- Guda, K., et al. (2001). Aberrant transforming growth factor-beta signaling in azoxymethane-induced mouse colon tumors. *Mol Carcinog.*, 31: 204-13
- Guda, K., et al. (2003). Defective processing of the transforming growth factor-beta1 in azoxymethane-induced mouse colon tumors. *Mol. Carcinog.*, 37: 51-9

- Gulati, K., Ray, A., Debnath, P.K., Bhattacharia, S.K. (2002). Immunomodulatory Indian Medicinal Plants. *Journal of Natural Remedies*, 2 , 2, 121-131

## H

- Hanahan, D. & Weinberg,R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer, 100, 57-70.
- Hanahan, D., Robert, A., & Weinberg,R.A. (2011). The Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144 , 246-274.
- Hardy, R.G., Meltzer, S.J., Jankowski J.A. (2000). ABC of colorectalcancer. Molecular basis for risk factors. *Br. Med. J.*, 321, 886-889.
- Hatuikulipi, TN., Kouachi, M., Bouchetob, L.E., Naimi, D. (2016). Preventive effect of *Helix aspersa* slime against experimentally chemo-induced colitis in rat. *Der Pharmacia Lettre*, 8 ,13, 200-206.
- Hawk, E.T, Uma,r A, Viner, J.L. (2004). Colorectal cancer chemoprevention—an overview of the science. *Gastroenterology*, 126:1423–47.
- Holdt S.L., Kraan S., (2001). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 23: 543-597.

## I

- Iqbal, M., Sharma, S.D., Okazaki, Y., Jujisawa, M., Okada, S. (2003). Dietary supplementation of curcumin enhanced antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddYmale mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocity. *Pharmacol. Toxicol.*, 92, 33-38.

## J

- Jaques, L.B., Ballieux, R.E, Dietrich, C.P., Kavanagh, L.W., (1968). A microelectrophoresis method for heparin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 46, 351-360.

## K

- Katiyar, C.K., Brindavanam, N.B., Tiwari, P., Narayana. D.B.A. (1997). In:Upadhyaya SN (Ed) Immunomodulation. Narosa Publishing House: New Delhi. 163-187.
- Keita, A. (1997). Etude morphologique et anatomique de quatre espèces d'escargots comestibles en Tunisie. DEA Faculté des Sciences. De Tunis.
- Kewenter, J., Ahlman, H., Hulten, L. (1978). Cancer risk in extensiveulcerativecolitis. *Ann. Surg.*, 188, 824-848.
- Kornprobst, J.-M. (2005). *Substances Naturelles D'origine Marine: Chimiodiversité, Pharmacodiversité, Biotechnologies*; Lavoisier: Paris, France, Volume 1.
- Koutroubakis,I.E., Malliaraki, N., Dimoulios, P.D., K. Karmiris, K., Castanas,E., Kouroumalis, E.A. (2004). *Dig Dis Sci*, 49, 9, 1433-1437.
- Kroemer, G., Galluzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, G., Alnemri, E.S., & al (2009). Classification of cell death. *Cell Death Differ*, 16, 1, 3-11.

## L

- Langman, M. & Boyle, P. (1998). Chemoprevention of colorectal cancer. *Gut*, 43, 578–585
- Lièver, A & Laurent- Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro dig.* 2 (1) : 38-42
- Liu, Y. Z., Cao, Y. G., Ye, J. Q., Wang, W. G., Song, K. J., Wang, X. L., ... Deng, X. M. (2010). Immunomodulatory effects of proanthocyanidin A-1 derived in vitro from *Rhododendron spiciferum*. *Fitoterapia* 81,2, 108–14.

## M

- MacPherson, B., Pfeiffer, C.J. (1976). *Digestion*, 14, 424-52.
- Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. (2006). Immunology. 7<sup>th</sup>. Ed Elsevier; 3.
- Marotta, F., et al. (2003). Chemopreventive effect of a probiotic preparation on the development of preneoplastic and neoplastic colonic lesions: an experimental study. *Hepatogastroenterology*. 50: 1914-8
- Mebirouk, R., Naimi, D., Riani, M., Antonicelli, F. (2016). Comparartive study of two *Helix aspersa* extracts on tumor cell lines (HUT-78 and SEAX) proliferation and MMP – 9 secretion. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 11, 288-293.

- Merouane, F. (2016). Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par la souche *Micromonosporaaurantiaca* GF44c, et tests biologiques. *Biotechnologies Microbiennes, Génomes et Environnement. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Frères Mentouri Constantine, Algérie.*, 85 – 104.
- Montoya, R. G., & Wargovich, M. J. (1997). Chemoprevention of gastrointestinal cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 16, 405–419.
- Müller, O. F., (1774). *Vermivmterrestriumetfluviatilium, seuanimaliuminfusorium, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succinctahistoria. Volumenalterum. I-XXXVI, 59.*
- Müller, O.F. (1774). *Vermivmterrestrium et fluviatilium, seuanimaliuminfusorium, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Volumenalterum. - pp. I-XXXVI [= 1-36], 1-214, [1-10]. Havniæ&Lipsiæ. (Heineck& Faber); p. 59*

## N

- Nudo, L. P., & Catap, E. S. (2011). Immunostimulatory effects of *Uncariaperrottetii*(A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) vinebark aqueous extract in Balb/C mice. *Journal of Ethnopharmacology*;133,2, 613–20.

## P

- Pierre, G. (2010). Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. *Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR CNRS 6250. 119-126.*
- Portt, L., Norman, G., Claoo, C., Greenwood, M.T. (2011). Anti-opoptosis and cell survival. *Biochimica et Biophysica Acta. 1813, 238-259.*

## R

- Rajasekarna, A., Sivagnanam, G. Xavir. R. (2008). Neutraceuticals as therapeutic agents. *Reaserch J. Pharm. And Tech.* 1 (4): 328-340
- Relan, N.K. (1995). Identification and evaluation of the role of endogenous tyrosine kinases in azoxymethane induction of proliferative processes in the colonic mucosa of rats. *Biochim Biophys Acta.*, 1244(2-3): 368-76

- Reversat, G., (1976). Etude de la composition biochimique globale des juvéniles des nématodes *Meloidogyne javanica* et *Heterodera oryzae*. *ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XI, 3, 225-234
- Roncucci, L., M. Pedroni, M., Vaccina, F., Benatti, P., et al., . (2000). *Cell Prolif*, 33, 1, 1–18.

## **S**

- Sarni-Manchad, P & Cheynier, V. (2005). Les polyphénols en agroalimentaire. Tec & Doc Lavoisier, Sciences et techniques agro-alimentaires.
- Sasaki T, Nakamura T, Rebhun RB, Cheng H, Hale KS, Tsan RZ, Fidler IJ, Langley RR. (2008). Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growth factor alpha-epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model. *Am J Pathol*. 173(1):205-16.
- Serrano, D, Lazzeroni, M, Decensi, A. (2004). Chemoprevention of colorectal cancer: an update. *Tech Coloproctol* , 8Suppl 2, 248–52.
- Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-mickalad, A., Deby-dupont, G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophils, une enzyme de defense aux capacités antioxydantes. *Ann. Méd. Vét*; 147, 78-93.
- Shalaby, A. & Shatta, A. (2013). *Academic Journals.*, 1996-0816,1835.
- Shalaby, A. & Shatta, A. (2013). Potential antioxidant and anti-inflammatory effects of *Hyphaenathebaicin* experimentally induced inflammatory bowel disease. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*, 7, 26, 1834-1840
- Sharon, P. & Stenson, WF. (1985). *Gastroenterology*, 88, 1, 55-63.
- Shike, M., Winawer, S.J., Greenwald, P.H., Bloch, A., Hill, M.J., Swaroop, S.V. (1990). Primary prevention of colorectal cancer: the WHO Collaborating Centre for Prevention of Colorectal Cancer. *Bull. World Health Organ.*, 68, 377–385.
- Sidiq, T., Khajuria, A., Suden, P., Sharma, R., Singh, S., Suri, K. A., ...Johri, R. K. (2011). Possible role of macrophages induced by an irridoid glycoside (RLJ-NE-299A) in host defense mechanism. *International Immunopharmacology* ;11(1) : p 128–35.

- Singhal, M., & Ratra, P. (2013). Investigation of Immunomodulatory Potential of Methanolic and Hexane Extract of *Musa acuminata* Peel (Plantain) Extracts. *Global J Pharmacol* , 1, 69–74.
- Singleton, V.L. Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am J EnolViticult* , 16, 144-158.
- Sorenson, K.K., Sveinbjornsson, B., Dalmo, R.A., Smedsrod, B., Bertheussen, K. (1997). Isolation, cultivation and characterization of head kidney macrophages from Atlantic cod (*Gadusmorhua*L.). *J. Fish Dis*, 2, 93-107.
- Steele, V. E., Boone, C. W., Lubet, R. A., Crowell, J. A., Holmes, C. A., Sigman, C. C., Kelloff, G. J. (1998). Preclinical drug development paradigms for chemopreventives. *Hematol.Oncol.Clin. North Am.*, 12, 943–961.

## T

- Tanaka, T. (2001). Development of an Inflammation-Associated Colorectal Cancer Model and Its Application for Research on Carcinogenesis and Chemoprevention. *International Journal of Inflammation*. Vol 2012: 7-8.
- Toader-Williams, A and Bulletin BO. (2011). UASVM Animal Science and Biotechnologies, 2 68, 1-2.

## V

- Verma, S.K., Sing,. S.K., Singh, S., Mathu,r A. (2010). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2, 4, 861-865.
- Verma, S.K., Singh, S.K., Mathur, A., Singh, S. (2010). *International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research*, 1, 1, 37-39.
- Verma, S.K., Singh, S.K., Singh, S., Mathur, A. (2011). *Environment Conservation Journal*, 2, 1, 174-181.
- Vermeire, S., Van Assche, G., Rutgeerts, P. (2004). *Inflamm Bowel Dis.*, 10, 5, 661-665.
- Visavadiya, N. P., Narasimhacharya, A. V. R.L. (2005). *Indian J Pharmacol*, 37, 376-380.

## W

- Wargovich, M. J., Brown, V. R. Morris. J. (2010). *Cancers*, 2, 1705-1716.

## **Z**

- Zama, D., Meraihi, Z., Tebibel, S., Benayssa, W., Benayache, F., Benayache, S., et al., (2007). *Indian J Pharmacol*, 39,3,145-150.



**Caractérisation et étude des propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires et antitumorales des molécules bioactives extraites d'*Helix aspersa* : application dans la prévention du cancer colorectal expérimental chimio induit.**

**RESUME**

Un système immunitaire compétent est capable de détecter et d'éliminer non seulement les virus et les bactéries, mais aussi les cellules cancéreuses. Cependant, ces cellules peuvent développer une stratégie d'échappement permettant la formation de tumeurs malignes suite à une immunosuppression. Il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles molécules anti tumorales avec un potentiel immunostimulant. La recherche dans ce domaine s'intéresse principalement à l'extraction et la purification de ces molécules à partir de plantes médicinales. Cependant, l'objectif de notre travail est de chercher et de mettre en évidence l'effet immunomodulateur des extraits d'origine animale : l'escargot *Helix aspersa*, une espèce très répandue et largement consommée dans les pays méditerranéens. Notre travail débute par une caractérisation des extraits (bave, homogénat et extrait aqueux) et une évaluation de la dose toxique dans le but de choisir les doses adéquates à utiliser lors de nos expérimentations. Les extraits n'ont présenté aucune toxicité envers les animaux d'expérimentation ; les doses de 20 ml/Kg de bave, 5 mg/Kg d'homogénat et 300 µl/souris d'extrait aqueux ont été choisies. L'effet immunomodulateur s'est avéré immunostimulant lors de la réalisation d'un test de clairance du carbone, ce qui nous a amené à étudier d'autres effets thérapeutiques. Nos extraits exercent aussi un effet anti-inflammatoire envers la colite expérimentale chimio-induite. Les colites chroniques non traitées sont susceptibles de se développer en tumeur colorectale. L'effet anti-inflammatoire des extraits nous a incité à vérifier l'effet anti-prolifératif des cellules tumorales. La recherche de l'effet antitumoral a été réalisée *in vitro*, sur une culture de cellules tumorales mammaires MCF7 et *in vivo*, sur un cancer colorectal expérimental chimio induit. L'expérimentation *in vitro* a montré une inhibition de la prolifération des cellules tumorales à 56.39%. *In vivo*, l'observation des coupes histologiques des colons a confirmé que les extraits ont réparé l'architecture de la muqueuse colique après l'installation de la tumeur chimio induite. L'escargot *Helix aspersa* possède plusieurs effets thérapeutiques. Il serait donc intéressant de l'introduire dans l'alimentation quotidienne en guise de prévention ou en complément alimentaire dans un but curatif.

**Mots clés :** *Helix aspersa*, bave, homogénat, extrait aqueux, immunostimulation, inflammation, prolifération tumorale.

**Membres du jury :**

Présidente :	Mme. SATTI Dalila.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directrice de thèse :	Mme. NAIMI Dalila.	Professeur	ENSB Taoufik Khaznadar-Constantine
Examinatrice :	Mme. HAMBABA Leila	Professeur	U. Hadj Lakhdar- Batna
Examinatrice :	Mme. BERCHI Selima	Professeur	ENSB Taoufik Khaznadar-Constantine
Examinatrice :	Mme. TEBIBEL Soraya	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine

Année Universitaire : 2016-2017