

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 30/mag/2013

N° de série : 01/MBio/2013

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MAGISTER EN MICROBIOLOGIE
Option : Microbiologie Appliquée et Biotechnologie Microbienne

Présenté par :
HAMMOUD Rima

Thème
Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne
de l'homogénat du gastéropode: *Helix aspersa*

Soutenu le : 30 mai 2013

Devant le jury :

Président : **Mr A. BOULAHROUF** Professeur à l'université de Constantine 1
Rapporteur : **Mme D. NAIMI** Professeur à l'université de Constantine 1
Examineurs: **Mr M. KITOUNI** Maître de conférences à l'université de Constantine 1
Mr D. BOUDDAH Maître de conférences à l'université de Constantine 1

2012 – 2013

Table de matières

Remerciements	
Dédicace	
Introduction.....	1
Revue bibliographique	
Chapitre 1 : Le stress oxydant	
1-Définition du stress oxydant.....	3
2-Marqueurs biologiques du stress oxydant.....	3
2-1- Marqueurs de la peroxydation lipidique.....	3
2-2-Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés.....	4
2-3-Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques.....	4
3-Evaluation du stress oxydant.....	5
3-1-Mesure des radicaux libres.....	5
3-2-Mesure des systèmes antioxydants.....	6
3-2-1- Mesure des systèmes enzymatiques.....	6
3-2-2-Mesure des systèmes non enzymatiques.....	6
3-3-Mesure des dommages biologiques.....	7
3-3-1-Mesure des produits de la peroxydation lipidique.....	7
3-3-2-Mesure des produits de l'oxydation des protéines et des acides aminés.....	8
3-3-3-Mesure des produits de l'oxydation des acides nucléiques.....	8
4-Pathologies liées au stress oxydant.....	9
Chapitre 2 : L'hyperhomocystéinémie	
1-Origine et métabolisme de l'homocystéine.....	11

1-1-Métabolisme de l'homocystéine.....	11
1-1-1-Les voies de reméthylation.....	13
1-1-2-La voie de la transsulfuration.....	13
1-2-Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine.....	13
1-3-Devenir métabolique de l'homocystéine.....	14
1-4-Mesure de la teneur en homocystéine des tissus biologiques.....	16
2-L'hyperhomocystéinémie.....	16
2-1-Définition de l'hyperhomocystéinémie.....	16
2-2-Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie.....	17
2-2-1-Les facteurs environnementaux.....	17
2-2-2-Les facteurs nutritionnels.....	17
2-2-3-Les facteurs génétiques.....	18
3-Pathogénicité de l'homocystéine.....	18
4-Le statut oxydant en hyperhomocystéinémie.....	19
5-Traitement de l'hyperhomocystéinémie.....	20
Chapitre 3 : Les gastéropodes « Escargots »	
1-Etymologie.....	21
2-Classification.....	21
3- <i>Helix aspersa</i> Müller (Petit-gris) - Distribution géographique.....	21
4-Descriptions morphologique et anatomique du Petit-gris.....	23
4-1-La coquille.....	23

4-2-Le corps.....	25
5-Ecophysiologie du Petit-gris.....	25
5-1-Activité saisonnière.....	25
5-2-Reproduction et croissance.....	26
5-3-Prédation-Parasitisme.....	27
5-3-1-Principaux prédateurs.....	27
5-3-2-Principaux parasites.....	27
6-Qualité nutritionnelle des escargots.....	28
7-Utilisation de l'escargot par l'homme.....	28

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1-Matériel biologique.....	29
1-1-Les escargots.....	29
1-2-Les rats.....	29
1-3-Les microorganismes utilisés.....	29
2-Méthodes.....	29
2-1-Évaluation de l'activité antioxydante de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i> chez le rat	
2-1-1-Préparation de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	29
2-1-2-Traitement des rat.....	30
➤ Expérience I : Action de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat.....	31
➤ Expérience II : Effet de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i> associé au traitement de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat.....	31

2-1-3-Dosage du MDA et des protéines totales.....	32
2-1-3-1- Dosages plasmatiques.....	32
2-1-3-1-1-Dosage du MDA plasmatique.....	32
2-1-3-1-2-Dosage des protéines totales plasmatiques.....	33
2-1-3-2-Dosages tissulaires.....	35
2-1-3-2-1- Dosage du MDA tissulaire.....	35
2-1-3-2-2-Dosage des protéines totales tissulaires.....	35
2-2-Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	36
2-2-1-Préparation des extraits bruts organiques de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	36
2-2-2-Mise en culture des souches cliniques bactériennes, fongiques et levurienne.....	36
2-2-3-Mise en évidence de l'activité antibactérienne, antifongique et anticandidale des différents extraits organiques bruts de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (méthode des disques en papier).....	37
2-3-Analyses statistiques.....	37

Résultats et discussion

1-L'évolution du poids des animaux et la quantité de l'aliment consommé pendant toute la durée de l'expérimentation.....	38
2-Activité antioxydante de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	42
2-1-Expérience I (action de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat).....	42
2-2-Expérience II (effet de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i> associé au traitement de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat).....	46
3-Activité antimicrobienne de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	53
3-1-Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	53
3-2-Caractérisation préliminaire des molécules bioactives contenues dans l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	61

Conclusion et Perspectives.....	62
Références bibliographiques.....	64
Annexes.....	79
Résumés.....	85

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein des laboratoires de Biologie Physiologie Cellulaire et Moléculaire et de Génie microbiologique et applications de l'université de Constantine 1.

Ce travail a été dirigé par Mme D. NAIMI. Professeur à l'université de Constantine 1. Je la remercie pour m'avoir permis de travailler sur un thème de recherche aussi riche et passionnant.

Je remercie très sincèrement Mr A. BOULAHROUF. Professeur à l'université de Constantine 1 de m'avoir fait l'honneur d'être le président du jury.

Mes remerciements vont ensuite à Mr M. KITOUNI. Maître de conférences à l'université de Constantine 1, et Mr D. BOUDDAH. Maître de conférences à l'université de Constantine 1 d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements et gratitude, qui ne sera jamais concrètement exprimé à l'égard de mes chères amies Karima et Housna pour leur grande aide dans les diverses difficultés que j'ai rencontrées, leur disponibilité et leur soutien moral ; qu'elles trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je ne remercierai jamais assez Yasmina et Manel pour les nombreux services qu'elles m'ont rendus durant la réalisation de ce travail.

Aussi et à l'occasion, je tiens à remercier ma chère tante Samira pour son aide, sa disponibilité et son soutien.

Enfin, Je ne serais achevé sans remercier toute ma famille, surtout ma chère mère et tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de cette œuvre.

DEDICACES

Avec l'aide de dieu j'ai pu terminer ce modeste travail que je dédie :

À mes chers parents à qui je dois toutes mes réussites ;

À la mémoire de mes grands-parents et ma tante, que leurs âmes reposent en paix ;

À mon frère et mes sœurs ;

À tous mes oncles, tantes, cousins et cousines ;

À mima Houda et toute la famille Jaballi ;

À toutes mes amies ;

À tous mes médecins et kinésithérapeutes ;

À ma promotion de post-graduation de microbiologie appliquée ;

À tous ceux que j'aime.

Liste des abréviations

ADMA	Aiméthylarginine asymétrique
BHMT	Bétaine homocystéine méthyltransférase
BSA	Sérum bovine albumine
CBS	Cystathionine beta synthase
CGL	Cystéine- γ -lyase
CPG-MS	Chromatographie en phase gazeuse en fragmentation de masse
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAD	Flavine adenine dinucléotide
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion réduit
Hcy	Homocystéine
HO·	Radical hydroxyle
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
tHcy	Homocystéine totale
HPLC (ou CLHP)	Chromatographie Liquide Haute Performance
HTL	Homocystéine thiolactone
4-HNE	4-hydroxy-2-nonéal
8-iso-PGF₂α	8-iso-prostaglandine deux alpha
LDL	Low density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
MAT	Méthionine adénosyl-transférase
MDA	Malondialdéhyde (dialdéhyde malonique)
MTHFR	Méthylène tétrahydrofolate réductase
MTR	Méthionine synthase
NADPH, H⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NBT	Nitrobleu de tétrazolium
NO	Oxyde nitrique
eNOS	Enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique
O₂⁻	Radical (anion) superoxyde
ONOO-	Peroxynitrite

8-OH-dG	8-hydroxy-2-désoxyguanosine
RO₂-	Radical peroxyde
ROOH	Radical hydroperoxyde
RPE	Résonance paramagnétique électronique
SAH	Sulfonium-adenosyl-L-homocystéine
SAHH	Sulfonium-adenosyl-L-homocystéine hydrolase
SAM	Sulfonium-adenosyl-L-méthinine
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Tri-chloroacétique acid
TCN	Transcobalamine
THF	Tétrahydrofolate
TRAP	Total radical trapping parameter (pouvoir antioxydant total du plasma)

Liste des tableaux

Tableau 1: Données des concentrations du BSA pour établir une gamme étalon.....	34
Tableau 2 : Récapitulatif des résultats du poids de l'animal et de l'aliment consommé durant toute la période de l'expérimentation.....	40
Tableau 3 : Taux du MDA et des protéines totales de l'expérience I.....	43
Tableau 4 : Taux du MDA et des protéines totales de l'expérience II	48
Tableau 5: Activité antimicrobienne en (mm) des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i> envers les bactéries-tests.....	55
Tableau 6 : Activité antimicrobienne en (mm) des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i> envers les champignons filamenteux test et la levure <i>Candida albicans</i> UMIP 88465.....	56

Liste des figures et photographies

Figure 1 : Structure chimique de l'homocystéine.....	11
Figure 2 : Représentation du métabolisme de l'homocystéine.....	12
Figure 3 : Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain.....	15
Figure 4 : Coquille de l'escargot « Petit-Gris »	22
Figure 5 : Schéma de l'anatomie interne de l'escargot.....	24
Figure 6 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.....	32
Figure 7 : Courbe étalon du MDA	33
Figure 8 : Courbe étalon des protéines totales.....	34
Figure 9 : Évolution du poids des rats pendant toute la durée de l'expérimentation.....	41
Figure 10 : Évolution de la quantité de l'aliment consommé par les rats pendant toute la durée de l'expérimentation	41
Figure 11 : Taux du MDA plasmatique chez les rats lors de l'expérience I.....	44
Figure 12 : Taux du MDA hépatique chez les rats lors de l'expérience I.....	44
Figure 13 : Taux des protéines totales plasmatiques chez les rats lors de l'expérience I.....	45
Figure 14 : Taux des protéines totales hépatiques chez les rats lors de l'expérience I.....	45
Figure 15 : Taux du MDA plasmatique chez les rats lors de l'expérience II.....	49
Figure 16 : Taux du MDA hépatique chez les rats lors de l'expérience II	49
Figure 17 : Taux des protéines totales plasmatiques chez les rats lors de l'expérience II.....	50
Figure 18 : Taux des protéines totales hépatique chez les rats lors de l'expérience II.....	50
Figure 19 : Activité antibactérienne des extraits organiques de l'homogénat de l'escargot <i>Helix aspersa</i> préparés à partir de l'eau distillée.....	

Photographie 1 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *Escherichia coli* ATCC 25922. **EO** : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, **EM** : Extraits méthanoliques, **EH** : Extraits hénanoiques, **ED** : Eau distillée, **M** : Méthanol, **H** : Hexane. La photo c' est prise au grossissement (×1), et la photo b' est prise au grossissement (×2).....57

Photographie 2 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. **EO** : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, **EM** : Extraits méthanoliques, **EH** : Extraits hénanoiques, **ED** : Eau

distillée, **M** : Méthanol, **H** : Hexane. La photo b' est prise au grossissement ($\times 1$).....58

Photographie 3 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *Pseudomonas aeruginosa* **13**. **EO** : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, **EM** : Extraits méthanoliques, **EH** : Extraits hexanoïques, **ED** : Eau distillée, **M** : Méthanol, **H** : Hexane. Les photos a' et b' sont prises au grossissement ($\times 1$).....59

Photographie 4 : Activité antimicrobienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *a* et *b* *Candida albicans* **UMIP 88465**, *c* et *d* envers *Trichophytum rubrum* **CIP 204392**. **EO** : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, **EM** : Extraits méthanoliques, **EH** : Extraits hexanoïques, **ED** : Eau distillée, **M** : Méthanol, **H** : Hexane. Les photos a' et b' sont prises au grossissement ($\times 1$).60

Introduction

Bien que le stress oxydant ait été largement étudié depuis plusieurs décennies, nombre de médecins et biologistes sont encore sceptiques en ce qui concerne son intérêt en biologie et médecine.

Plusieurs facteurs sont connus comme causes et accélérateurs du stress oxydant ; ces facteurs peuvent être physiques, chimiques ou mécaniques (rayonnements Ultra-Violet, métaux lourds, tabagisme....etc) ; parmi ces facteurs nous avons choisi l'homocystéine (**Delattre et al., 2005**).

Il est clairement admis que l'hyperhomocystéinémie induit indéniablement un stress oxydatif. Au niveau moléculaire, cette hyperhomocystéinémie se traduit par une attaque des trois principaux composants cellulaires : les lipides, les protéines et les acides nucléiques en modifiant leurs structures et propriétés physico-chimiques, et en altérant leurs fonctions biologiques (**Pincemail, 1998**).

Diverses molécules biologiques peuvent combattre contre le stress oxydant. Notre choix s'est porté sur l'escargot, petit animal bien connu de nos comptines d'enfant, il a été, à travers les siècles l'objet de nombreuses attentions ; tour à tour animal mythique et symbolique, défié ou objet du diable, il suscite le dégoût ou l'admiration.

Apprécié en cuisine, il l'est aussi en médecine, domaine dans lequel on n'a cessé depuis l'Antiquité de lui attribuer de multiples vertus.

C'est alors principalement l'*Helix pomatia* (escargot de Bourgogne) qui est utilisé, mais également *Helix aspersa* ou encore l'escargot de mer : *Helix maritima*.

Avec le temps, la diversité d'emploi des escargots en thérapeutique s'est amoindrie pour tendre vers la fabrication de spécialités dont les propriétés sont reconnues et prouvées, et même s'est dirigée vers des utilisations insoupçonnées (**Bonnemain, 2003**).

C'est dans cette optique que s'insère l'objet de cette présente contribution. Elle se propose de :

- Évaluer l'effet antioxydant de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* chez des rats Wistar soumis à une dose élevée de méthionine qui induit une hyperhomocystéinémie.
- Explorer son effet antimicrobien.

Pour cela, nous avons dosé le MDA plasmatique et tissulaire, et nous avons testé cet homogénat sur quelques souches bactériennes, fongiques et levurienne.

La première partie de notre travail met le point sur les données bibliographiques actuelles concernant les gastéropodes, le stress cellulaire de manière générale et l'hyperhomocystéinémie en particulier.

La seconde partie expose l'approche expérimentale dont les résultats sont discutés à travers des courbes, histogrammes et photographies.

Revue bibliographique

Chapitre 1 :

Le stress oxydant

1-Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO), en faveur de ces dernières. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (**Favier, 1997 ; Delattre *et al.*, 2005**). Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition des cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique (**Pincemail, 1998**).

2-Marqueurs biologiques du stress oxydant

Les radicaux libres peuvent interagir avec des protéines, de l'ADN, des lipoprotéines et des acides gras polyinsaturés pour former des dérivés oxydés pouvant être décelés dans des échantillons biologiques comme le plasma, le sérum ou l'urine (**Pincemail *et al.*, 1999**).

2-1-Marqueurs de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique désigne l'attaque des lipides (principalement les acides gras polyinsaturés) par des radicaux libres, comme le radical hydroxyle (HO^\bullet), capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Il s'agit d'une réaction en chaîne qui se poursuit par la transformation du radical peroxyde (RO_2^\bullet), au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué. Les radicaux diènes conjugués, sous l'action de l'oxygène, se transforment en hydroperoxydes (ROOH) qui peuvent, soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase, soit continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et alcanes volatiles. Le radical peroxyde peut évoluer en un peroxyde cyclique dont la coupure peut libérer également des aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonéal (**Gueye, 2007**).

Cette attaque des lipides peut concerner aussi bien les phospholipides membranaires que les lipoprotéines circulantes, avec évidemment des conséquences différentes. En effet, l'atteinte des

phospholipides membranaires va entraîner une modification de la fluidité membranaire, altérer les systèmes de transfert d'ions ainsi que le fonctionnement de nombreux transporteurs, récepteurs et affecteurs des voies de transduction des signaux (**Champ *et al.*, 1997 ; Favier, 2003**). L'attaque des lipoprotéines circulantes, notamment les lipoprotéines à faible densité (LDL), va aboutir à l'oxydation de ces dernières, qui seront ensuite captées par les macrophages pour donner des cellules spumeuses à la base du dépôt lipidique de la plaque d'athérome (**Favier, 2003 ; Delattre *et al.*, 2005**).

2-2-Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible de réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications sous l'action des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et celles de l'azote (ERN), ou des métaux de transition (**Stadtman, 1990**). Les protéines atteintes peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires. Les dommages oxydatifs peuvent se manifester par l'apparition de groupements hydroperoxydes, l'oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à une fragmentation des protéines et/ou à la formation de liaisons croisées intra- ou inter-chaînes et à l'apparition de groupements carbonylés ou dicarbonylés. On peut également observer une oxydation des chaînes latérales des acides aminés, notamment de la cystéine et de la méthionine, avec formation de ponts disulfures. La nitration des protéines par le peroxy-nitrite se traduit par l'inactivation de nombreuses enzymes telles que la Mn-superoxyde dismutase (**Stadtman, 1993 ; Grune *et al.*, 1998**). Les acides aminés et protéines peuvent subir d'autres modifications d'une façon indirecte comme la glyco-oxydation et la lipo-oxydation. Certains acides aminés comme la phénylalanine et la tyrosine peuvent subir un processus d'hydroxylation qui génère la formation d'ortho- et de méta-tyrosine dans le cas de la phénylalanine (**Davies *et al.*, 1999**). Les protéines comportant un pont sulfhydryle sont les plus sensibles aux attaques radicalaires. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui, après oxydation, deviennent inactives et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (**Sen, 2001**).

2-3-Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires. Les lésions induites par les radicaux libres au niveau de ces molécules peuvent consister en des modifications de bases, des cassures simple-brin ou

double-brin de la chaîne oligonucléotidique, ou des pontages avec des résidus protéiques. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome. La recherche des produits d'oxydation peut être réalisée dans des cellules circulantes isolées ou dans des biopsies, mais aussi dans l'urine où se trouvent les composés oxydés (bases ou nucléosides) après excision par les enzymes de réparation (**Favier, 1997**). De nombreux produits de réaction des radicaux libres sur l'ADN ont été identifiés, tels que la 8-hydroxy-adénine, le thymidine glycol, la 8-hydroxy-guanine, la 8-hydroxy-guanosine, la 5-hydroxy-méthyl-uracil, le cytosine-glycol. Parmi ces composés, deux d'entre eux se sont révélés être des marqueurs intéressants. Il s'agit de la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) et du thymidine glycol (**Demple, 1991**).

3-Evaluation du stress oxydant

Le stress oxydant peut être évalué par trois grandes voies d'approches (**Delattre et al., 2003 ; Favier, 2003**) :

- La mesure de la production des ERO.
- La mesure des capacités de défense antioxydante.
- La mesure des désordres biochimiques spécifiques créés par l'attaque des radicaux libres sur les principales cibles moléculaires (protéines, lipides et acides nucléiques).

3-1-Mesure des radicaux libres

La détection et la quantification des radicaux libres est actuellement possible grâce à l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique (RPE). Malheureusement, c'est une méthode de sensibilité modeste et la durée de vie extrêmement courte des radicaux libres n'est pas compatible avec la prise de sang et son transfert au laboratoire (**Favier, 1997**). Aussi, la technique du « spin trapping » est souvent employée. Elle consiste à réaliser une réaction d'addition entre le radical et un autre composé (en général un nitroxyde) pour obtenir un produit radicalaire d'une durée de vie plus longue et détectable par RPE. En pratique, il s'agira de prélever le spécimen biologique sur un agent dit « spin trap » et de le congeler immédiatement dans de l'azote liquide (**Favier, 1997 ; Delattre et al., 2003**).

Enfin, la chimioluminescence peut être utilisée pour mesurer la lumière produite par réaction des radicaux libres avec des sondes lucigéniques comme le luminol et la lucigénine (décomposition des radicaux libres), mais beaucoup d'interférences dues à la présence d'acide urique ou de peroxyde sont possibles (**Toreilles et Guerin, 1995**).

3-2-Mesure des systèmes antioxydants

3-2-1-Mesure des systèmes enzymatiques

Il est possible, pour évaluer le stress oxydant, de mesurer l'activité de certaines enzymes antioxydantes comme les superoxyde dismutases, les glutathion peroxydases, la glutathion réductase et la catalase (**Urso et Clarkson, 2003**).

Les superoxyde dismutases (SOD) sont dosées indirectement par une méthode proposée par Beauchamps et Fridovich (**Beauchamps et Fridovich, 1971**) et modifiée par Oberley et Spitz (**Oberley et Spitz, 1985**). Elle évalue la SOD par sa capacité à inhiber un flux d'anions superoxydes générés par le système xantine-xantine oxydase. Les radicaux libres produits par ce système réduisent le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en bleu de formazan dont l'absorbance est quantifiée. Par ailleurs, la mesure de la superoxyde dismutase exprimée en concentration de protéine peut être réalisée par dosage radio-immunologique (**Asayama et Burr, 1985**).

Comme les superoxyde dismutases, les glutathion peroxydases peuvent être dosées directement ou indirectement. En pratique courante, l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) érythrocytaire est la plus fréquemment mesurée. La détermination de l'activité de cette enzyme est basée sur la réduction d'un hydroperoxyde (ROOH) en présence de glutathion réduit (GSH). Les méthodes directes mesurent le glutathion non consommé par polarographie, mais les techniques les plus fréquemment utilisées sont des techniques indirectes utilisant la glutathion réductase comme enzyme auxiliaire, avec suivi de la consommation de NADPH, H⁺ à 340 nm (**Paglia et Valentine, 1967 ; Floche et Gunzler, 1984**). Par ailleurs, la mesure de la concentration de la protéine GPx est possible par dosage radio-immunologique (**Takahashi et al., 1987**).

Les activités d'autres enzymes telles que la glutathion réductase, la catalase, l'hème oxygénase et la thioréductase peuvent également être déterminées, mais l'interprétation des résultats est souvent difficile du fait des nombreux facteurs pouvant faire varier leur concentration, tels que la vitamine C ou la bilirubine (**Ryter et al., 2000 ; Pincemail et al., 2001**).

3-2-2-Mesure des systèmes non enzymatiques

Le plasma est riche en antioxydants de petite taille de types hydrophile (acide urique, vitamine C, glutathion, bilirubine...) et lipophile (vitamine A, ubiquinol...). Ces antioxydants sont

facilement dosables en routine par des méthodes spectrophotométriques (vitamine C, glutathion) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (ubiquinone, vitamine A et E, β -carotène) (**Pincemail et al., 1999 ; Urso et Clarkson, 2003**). Plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer le pouvoir oxydant total du plasma (TRAP : Total Radical Trapping Parameter). Le principe de sa détermination repose sur l'utilisation d'un système générant des radicaux libres qui se met en contact avec une cible (acide gras, sonde fluorescente) dont la destruction oxydative est suivie en fonction du temps par spectrophotométrie ou luminescence. Les antioxydants présents dans l'échantillon biologique vont interagir avec les ERO, et ce n'est qu'après leur consommation complète, que l'oxydation de la cible pourra démarrer. Le temps de latence (temps de démarrage avant l'oxydation) sera donc directement proportionnel à la quantité d'antioxydants présents dans l'échantillon plasmatique. Cette méthode est standardisée grâce à l'ajout d'une quantité connue de TROLOX, un dérivé hydrosoluble du tocophérol (**Valkonen et Kuusi, 1997 ; Prior et Cao, 1999**). Les résultats sont à interpréter avec prudence, car des augmentations des concentrations plasmatiques de l'albumine, de l'acide urique et de la bilirubine, liées à certaines pathologies, pourraient masquer le déficit en d'autres antioxydants (**Malliaraki et al., 2003**).

3-3-Mesure des dommages biologiques

3-3-1-Mesure des produits de la peroxydation lipidique

La détection spectrophotométrique de malonalaldéhyde (MDA) par le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) ; en milieu acide et chaud ; est la méthode la plus ancienne et la plus populaire pour mesurer la peroxydation lipidique (**Favier, 1997 ; Fukunaga, 1998 ; Lefèvre et al., 1998**). Le fait que d'autres substances soient susceptibles de réagir avec l'acide thiobarbiturique fait que, même en améliorant les étapes pré-analytiques (conditions de prélèvements, utilisation des conservateurs) et analytiques (fluorescence), la spécificité du dosage du MDA reste discutée (**Benzi, 1996 ; Lefèvre et al., 1998**). L'utilisation de la TBA est de plus en plus abandonnée au profit d'une méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), avec détection fluorimétrique qui dose le MDA sous sa forme libre (**Richard et al., 1992 ; Fukunaga, 1998 ; Steghens et al., 2001**).

Un autre aldéhyde génotoxique et carcinogène comme le MDA est également utilisé comme marqueur de la peroxydation lipidique : le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Il se mesure en routine au laboratoire par une méthode de HPLC (**Favier, 1997 ; Pincemail et al., 1999**). Une autre

méthode peut également être utilisée. Elle met à profit la propriété volatile du 4-HNE en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (**Favier, 1997 ; Delattre et al., 2003**).

Depuis quelques années, les recherches se sont orientées sur les F2-isoprostanes qui se forment suite à l'addition du radical hydroxyle sur une molécule d'acide arachidonique. Ces isoprostanes, dont la prostaglandine 8-PGF2 α est la plus représentative, sont produites dans le sang et sont ensuite excrétées dans l'urine où elles sont dosées par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (**Pincemail et al., 1999 ; Urso et Clarkson, 2003**). Le développement récent d'une méthode radio-immunologique, plus simple d'application et très rapide, va contribuer à populariser ce dosage encore trop peu connu (**Pincemail et al., 1999 ; Delattre et al., 2003**).

3-3-2-Mesure des produits de l'oxydation des protéines et des acides aminés

En présence de dinitrophénylhydrazine (DNPH), les dérivés carbonylés produits suite à l'oxydation des protéines peuvent être mis en évidence dans des échantillons biologiques par spectrophotométrie, par technique HPLC ou via des anticorps mono-et polyclonaux (**Levine et al., 1994 ; Urso et Clarkson, 2003**). La détermination de ces dérivés est assez délicate à mettre en œuvre du fait des nombreuses manipulations à effectuer. Par ailleurs, un manque de spécificité en relation avec des problèmes d'interférences dues à des aldéhydes ou à des cétones provenant des sucres a été rapporté (**Delattre et al., 2003**).

D'autres marqueurs d'oxydation des protéines, en particulier le sulfoxyde de méthionine, la nitrotyrosine et l'ortho-tyrosine, ont été décrits comme présentant une meilleure spécificité (**Davies et al., 1999**).

3-3-3-Mesure des produits de l'oxydation des acides nucléiques

Une technique très sensible et très facile à mettre en œuvre a été développée pour rechercher la présence des produits de l'oxydation des acides nucléiques. C'est la technique des comètes ou « Single Technique Cell Gel Electrophoresis ». Elle permet de mettre en évidence les dommages de l'ADN au niveau de la cellule entière (**Fairbairn et al., 1995 ; Collins, 1997 ; Szeto et al., 2002**). Elle est basée sur les propriétés de migration de l'ADN dans un champ électrique. Les cellules sont déposées dans un gel d'agarose coulé sur une lame de microscope. Les membranes plasmiques et nucléaires sont ensuite lysées et les lames sont incubées dans un milieu alcalin

fortement salin qui permet la décondensation de l'ADN s'expliquant en partie par la perte des protéines de type histone. Sous l'action d'un champ électrique, l'ADN chargé négativement se déplace vers l'anode. Après électrophorèse, l'ADN peut être visualisé au moyen d'un marqueur fluorescent spécifique : le bromure d'éthidium. En absence d'altérations, la structure super-enroulée de l'ADN formée autour des nucléosomes persiste. Une rupture de brin induite par une altération de l'ADN suffit de relâcher une partie de l'ensemble et à permettre la migration de boucles d'ADN hors du nucléotide en direction de l'anode, donnant ainsi une image de comète. L'ADN est alors réparti entre la tête de la comète (nucléotide) et la queue. L'intensité relative de la fluorescence mesurée dans la queue de la comète est directement proportionnelle à la fréquence de cassures dans l'ADN (**Collins, 1997 ; Pouget, 2000**).

En pratique courante, l'évaluation des lésions de l'ADN au cours du stress oxydant est surtout réalisée par la quantification des composés oxydés (bases ou nucléosides) dans l'urine par chromatographie en phase liquide (HPLC) avec détection électrochimique, ou par chromatographie en phase gazeuse (CPG-MS) en fragmentométrie de masse (**Urso et Clarkson, 2003 ; Delattre *et al.*, 2005**). Ces analyses exigent toutefois énormément de précautions lors de la préparation de l'échantillon et demandent beaucoup de temps de sorte qu'elles ne peuvent se pratiquer que dans le cadre d'un laboratoire de recherche (**Pincemail, 1999**).

Toutes les méthodes proposées pour évaluer le stress oxydant, quelles qu'elles soient, présentent toujours leurs propres spécificités et limites, montrant qu'il serait utopique de croire en l'existence d'un marqueur idéal et unique du stress oxydant (**Favier, 1997**). Evaluer correctement un statut oxydant ne pourra donc se réaliser que sur base de combinaisons de tests qui se compléteront. Dans tous les cas, une attention toute particulière devra être accordée aux conditions de prélèvement et de traitement des échantillons sanguins, car la plupart des molécules testées sont en réalité peu stables. Ces conditions pré-analytiques, bien que contraignantes, sont les principales garanties de résultats de qualité.

4-Pathologies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir sa cible (**Favier, 1997**). Ainsi, il a été décrit comme impliqué dans le développement de maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives et le

vieillesse accélérée. Il est également admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires ; le diabète et la maladie d'Alzheimer (**Montagnier *et al.*, 1998 ; Sorg, 2004**). Un champ d'investigations important est donc en train de s'ouvrir dans le domaine de diagnostic du stress oxydant et des thérapies permettant de limiter ses effets néfastes. La prise en compte de cette nouvelle discipline en routine clinique devrait révolutionner la médecine de demain et avoir un impact économique important en terme de soins de santé. Pour cela, il convient de disposer d'outils d'analyses performants et spécifiques devant permettre de le mettre en évidence et de l'évaluer.

L'hyperhomocystéinémie qui résulte de l'augmentation du taux de l'homocystéine plasmatique provenant de la méthionine, est considérée comme une composante très importante dans l'induction du stress oxydant. Les facteurs favorisant son déclenchement et ses conséquences biologiques sont exploitées dans le chapitre qui suit.

Chapitre 2 :

L'hyperhomocystéinémie

1-Origine et métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré découvert en 1933 par Vu Vigneaud, qui n'est pas retrouvé dans la structure des protéines, mais qui constitue un intermédiaire important dans la fonction de donneur de méthyle de la méthionine et dans le métabolisme de la méthionine vers les autres acides aminés soufrés comme la cystéine. Dans le plasma humain, environ 70-80% de l'homocystéine sont liés aux protéines, principalement l'albumine (Guilland *et al.*, 2003).

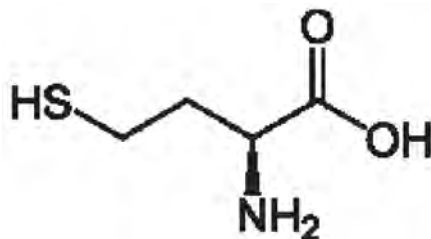


Figure 1 : Structure chimique de l'homocystéine

1-1-Métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine résulte de la transformation de la méthionine par une réaction de transméthylation (Aubard *et al.*, 2000). C'est sous l'action de la méthionine adénosyl-transférase (MAT, E.C.2.5.1.6) que la méthionine associée à l'ATP produit la S-adénosyl-méthionine (SAM) (Fig.2).

Tous les organismes possèdent un ou deux des trois isoformes de la MAT : MATI, MATII, et MATIII (Chamberlin *et al.*, 2000).

La S-adénosyl-méthionine est le donneur universel de groupements méthyles nécessaires au maintien de la méthylation cellulaire : ADN, ARN, protéines, lipides... etc. Ce transfert du méthyle, qui est catalysé par des méthyl-transférases, induit la synthèse de S-adénosyl-homocystéine (SAH). La S-adénosyl-homocystéine hydrolase (SAHH, E.C.3.3.1.1) catalyse la réaction de conversion de SAH en homocystéine et en adénosine. C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Elle est en plus en faveur de la synthèse de SAH que la synthèse de l'homocystéine (Chen, 2009).

Une fois synthétisée, l'homocystéine est métabolisée selon deux voies : voie de reméthylation et voie de transsulfuration.

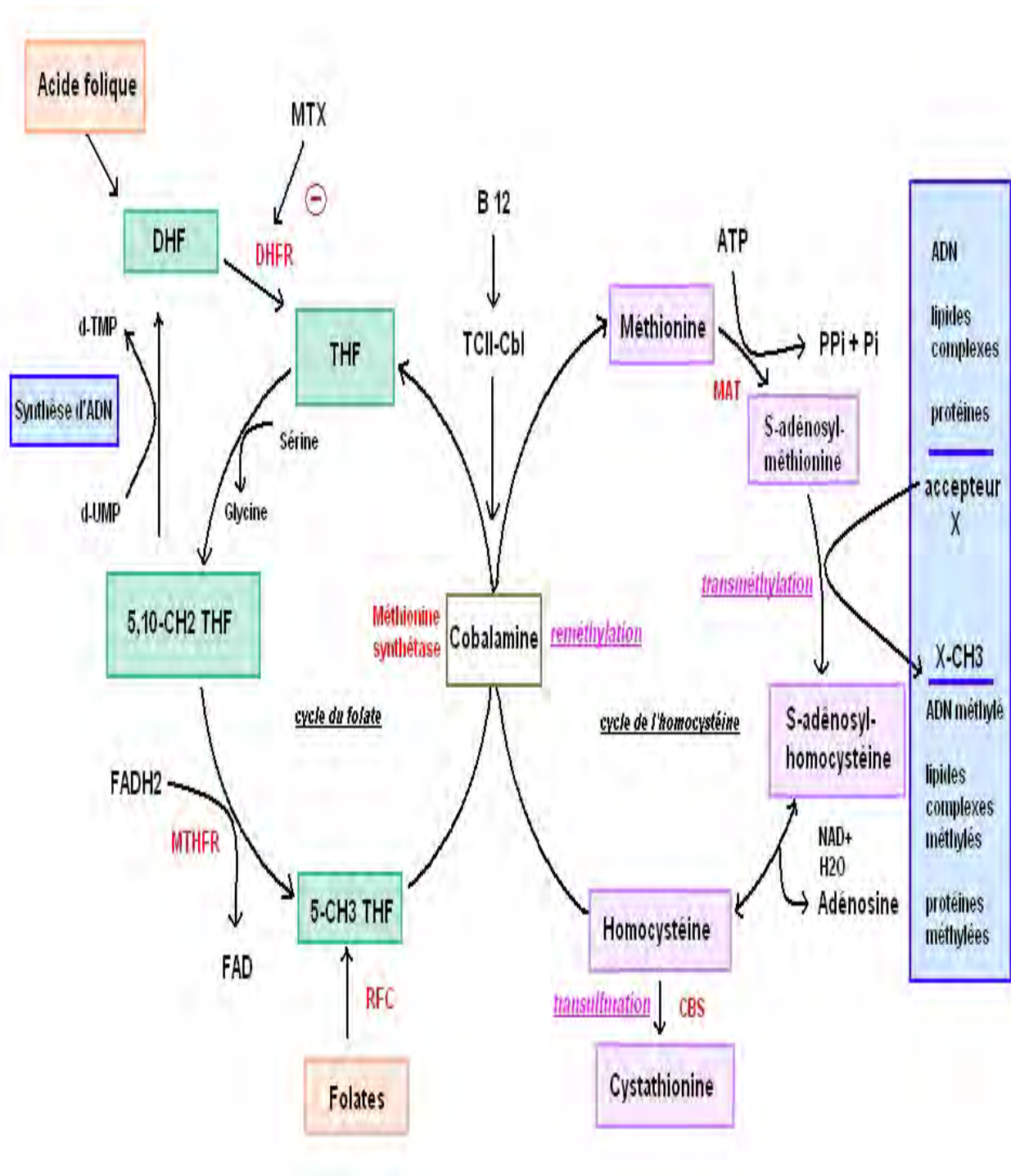


Figure 2: Représentation du métabolisme de l'homocystéine (d'après Akchiche, 2009)

1-1-1-Les voies de la reméthylation

La reméthylation de l'homocystéine pour former la méthionine est catalysée par une enzyme ubiquitaire : la méthionine synthase (MTR, E.C.2.1.1.13) dont le cofacteur est la vitamine B12 (**Chen, 2009**). La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la synthèse du 5-méthyl-tétrahydrofolate, qui est le donneur de groupements méthyles de la réaction précédente. Cette enzyme utilise la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur (**Demuth et al., 2000 ; Buyscharet et Hermans, 2003 ; Chen, 2009**).

Comme la méthionine synthase, la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT, E.C.2.1.1.5) catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, mais en utilisant la bétaine et non le méthyl-tétrahydrofolate comme donneur de méthyle. La bétaine provient de la nourriture comme les fruits de mer et les céréales ou l'oxydation de la choline. La BHMT est moins importante que la MTR car la BHMT n'est exprimée chez l'homme qu'au niveau du foie et du rein (**Sunden et al., 1997**) (Fig.2).

1-1-2-La voie de la transsulfuration

La transsulfuration est privilégiée lorsqu'il y a un excès de méthionine ou lorsqu'il existe un besoin accru en cystéine (**Buyscharet et Hermans, 2003**). La cystathionine β -synthase (CBS, E.C.4.2.1.22) condense le groupement thiol de l'homocystéine avec l'hydroxyle d'une sérine pour former la L-cystathionine. Ensuite, la L-cystathionine est clivée et désaminée en cystéine et en α -cétobutyrate par la cystéine- γ -lyase (CGL, E.C.4.4.1.1). Ces deux réactions irréversibles nécessitent la présence d'un cofacteur, le pyridoxal 5' phosphate ou la vitamine B6. Cette réaction se déroule au niveau du foie, du rein, du pancréas et de l'intestin (**Guilland et al., 2003 ; Brosman et al., 2004**).

La cystéine produite est utilisée pour la production de divers acides aminés soufrés, de taurine et de glutathion dont dépend le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire. Le taux d'homocystéine va donc dépendre d'une part des activités enzymatiques de la CBS, de la MS, de la MTHFR et de la disponibilité en THF, issus du métabolisme de l'acide folique (vitamine B9). Rappelons d'autre part que les vitamines B6 et B12 sont des cofacteurs indispensables au bon fonctionnement de ce cycle métabolique (**Aubard et al., 2000**) (Fig.2).

1-1-2-Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine

Les études sur la régulation du métabolisme de l'homocystéine ont montré que l'orientation

vers la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration est sous le contrôle de la disponibilité en méthionine et de SAM (**Mudd et al., 1980**). Lorsque l'apport en méthionine est normal, l'équilibre entre la transsulfuration et les voies de reméthylation est fortement régulé. La moitié de l'homocystéine est reméthylée, le reste emprunte la voie de transsulfuration.

En cas de déficit protéique, la méthionine intracellulaire est diminuée. La reméthylation est favorisée et l'homocystéine est recyclée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant de méthionine (**Demuth et al., 2000**). Dans ce cas, seulement 10% de l'homocystéine est catalysée par la cystathionine β -synthase (CBS). A l'inverse, lorsque l'apport protéique est excessif, la voie de la transsulfuration est favorisée par rétrocontrôle positif de la CBS et rétrocontrôle négatif de 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) (**Demuth et al., 2000**).

La capacité de l'organisme à adapter l'utilisation de l'homocystéine en fonction de l'apport en méthionine implique l'existence d'une régulation commune aux deux voies. Les données expérimentales obtenues principalement par la mesure in vitro de l'activité des enzymes suggèrent que cette coordination est réalisée par la SAM, considéré comme un effecteur allostérique de la cystathionine β -synthase (CBS, E.C.4.2.1.22) (**Guilland et al., 2003**). La fixation de la SAM sur le domaine de régulation de la CBS pourrait ne pas être coopérative, cependant cette liaison favorise un changement de conformation de l'enzyme, libérant le site actif. Donc, l'augmentation de SAM va provoquer un basculement du métabolisme de l'homocystéine vers son catabolisme : l'activation de la voie de la transsulfuration. La SAM est aussi un inhibiteur allostérique de la MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyl-tétrahydrofolate (**Janosik et al., 2001**).

1-3-Devenir métabolique de l'homocystéine

Après sa synthèse, l'homocystéine peut se transformer en plusieurs molécules. En fait, l'homocystéine libre ne compose que 1%-2% de l'homocystéine totale (tHcy). 98%-99% de l'homocystéine totale s'oxydent et circulent sous la forme de ponts disulfures (**Miner et al., 1997 ; Mudd et al., 2000**) :

1-75%-80% de l'homocystéine totale sont liés aux résidus réactifs de cystéine des protéines, la plupart sont avec des cystéines 34 d'albumine.

2-D'autres homocystéines sont sous la forme de ponts disulfures libres, homocystine (Hcy-Hcy) et cystéine homocystéine (Hcy-Cys).

L'homocystéine peut également s'oxyder en se cyclisant en thiolactone (HTL), ou se lier aux protéines par liaison amide (N-Hcy-protéine).N-Hcy-hémoglobine et N-Hcy-albumine

comportent respectivement 75% et 22% de Nprotéine totale (Jakubowski,2006).

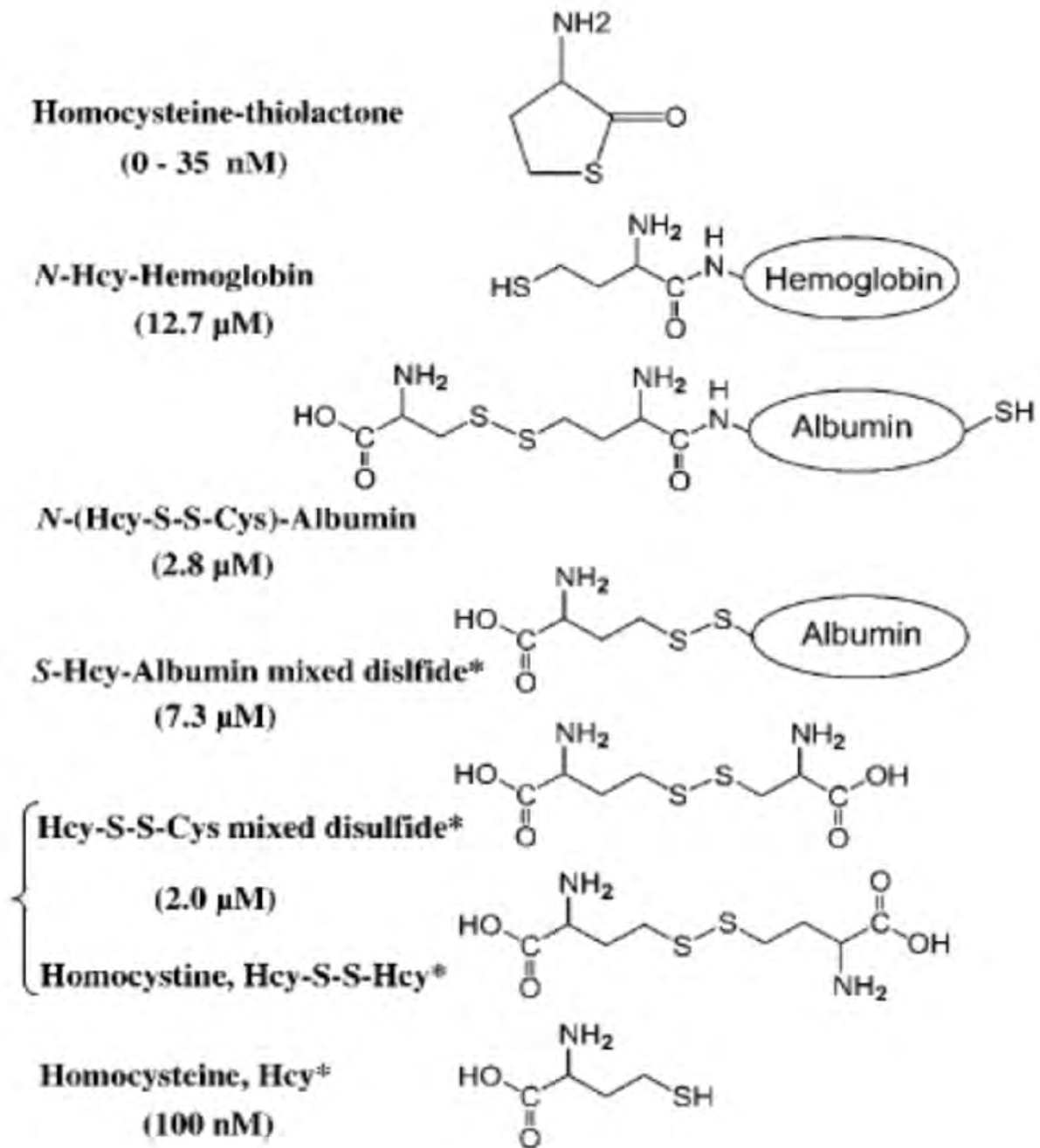


Figure 3: Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain

(D'après Jakubowski *et al.*, 2006)

Quand on mesure la concentration de l'homocystéine, tous les ponts disulfures sont réduits par un agent réducteur et toutes les homocystéines sont sous la forme de ponts disulfures passeront sous forme libre. Donc, le terme homocystéine totale est la somme de l'homocystéine libre et liée par le pont disulfure. L'homocystéine totale ne compte pas l'homocystéine thiolactone (HTL) et l'homocystéine liée aux protéines par le pont amide (N-Hcy-protéine), car cette liaison résiste au réactif réducteur, HTL et N-Hcy-protéine ne peuvent pas être réduits en homocystéine libre (**Chen, 2009**) (Fig.3).

Par ailleurs, une partie importante de l'homocystéine est métabolisée en cystathionine et transformée en cystéine puis en sulfates. Une autre partie de l'homocystéine est oxydée en acide homocystéique et acide homocystéine sulfinique. Une très faible partie est transaminée en un acide cétonique, l'acide α -céto γ -méthyl-thiobutyrique (**Favier et Caillat, 1977**).

1-4-Mesure de la teneur en homocystéine des tissus biologiques

. Le statut biologique en homocystéine est généralement évalué par le dosage de l'homocystéine totale (forme oxydée plus forme réduite) du sang. Cette mesure nécessite des techniques sensibles pour détecter les faibles augmentations induites par les déficits en vitamines. Cet objectif peut être atteint par plusieurs techniques telles que la chromatographie liquide avec détection fluorimétrique, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, l'enzymologie, l'immunochimie en polarisation de fluorescence (**Guilland, 2003 ; Zhloba et Blashko, 2004**).

Le jeûne doit être exigé pour tout dosage de l'homocystéine. L'association EDTA + NaF + K₂C₂O₄ semble être l'anticoagulant le plus adapté pour acheminer un prélèvement destiné à ce dosage. L'utilisation de cette association d'anticoagulants rendrait les conditions pré-analytiques du dosage de l'homocystéine plus simples et donc plus adaptables à des enquêtes sur le terrain et à des études épidémiologiques à large échelle (**Kchock et al., 2007**).

2-L'hyperhomocystéinémie

2-1-Définition de l'hyperhomocystéinémie

C'est un signe pathologique résultant d'une perturbation métabolique de l'une des deux voies (transsulfuration et reméthylation), et se définit par une valeur d'homocystéine plasmatique totale à jeun supérieure à 15 $\mu\text{mol/l}$. Cependant les sujets ayant des concentrations comprises

entre 10 et 15 $\mu\text{mol/l}$ pourraient présenter un risque graduel (**Ducros et al., 2001**).

2-2-Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

Les taux plasmatiques normaux (à jeun) d'homocystéine se situent entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$ (**Buyscharet et Hermans, 2003**). La classification de Kang et Coll définit 3 niveaux d'hyperhomocystéinémie : modérée (15 à 30 $\mu\text{mol/l}$), de grade intermédiaire (30 à 100 $\mu\text{mol/l}$) et sévère (>100 $\mu\text{mol/l}$) (**Kang et al., 1992**). L'hyperhomocystéinémie peut avoir pour origine des troubles d'ordre génétique, nutritionnel et environnemental.

2-2-1-Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux entraînent habituellement une hyperhomocystéinémie modérée (**Quiun et al., 1997 ; Demuth et al., 2000**). Les personnes âgées et de sexe masculin ont une hyperhomocystéinémie plus élevée que les personnes jeunes et de sexe féminin (**El Bouchti et al., 2008 ; Chen, 2009**). Certaines habitudes peuvent augmenter le taux de l'homocystéine telles que l'usage de tabac, café, alcool et l'activité physique (**Buyscharet et Hermans, 2003 ; Chen, 2009**).

L'hyperhomocystéinémie modérée peut être également liée à la prise de certains médicaments comme le méthotrexate qui bloque la dihydrofolate réductase, la phénytoïne, la carbamazépine qui interfèrent avec le métabolisme des folates, et l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS (**James et al., 1997 ; Quiun et al., 1997**). Il en est de même pour les médicaments interférant avec la vitamine B6 (azauridine) et avec la vitamine B12 (oxyde nitrique) (**Aubard et al., 2000**). Une hyperhomocystéinémie modérée est ainsi observée chez des patients atteints de maladies comme l'arthrite rhumatoïde, l'hypothyroïdie, les maladies inflammatoires chroniques et neurodégénératives, l'insuffisance hépatique, le déficit en zinc, des néoplasies (leucémies lymphoblastiques aiguës), une altération de la fonction rénale et certains cancers (cancer du sein, de l'ovaire et du pancréas) (**Roubnoff et al., 1997 ; Refsum et al., 1998 ; Barbé et al., 1999 ; Aubard et al., 2000 ; De Bree et al., 2002 ; Winder et al., 2002**).

2-2-2-Les facteurs nutritionnels

Plusieurs études ont montré qu'il existe une hyperhomocystéinémie chez les sujets soumis à une carence en vitamines B9, vitamine B12 et vitamine B6. Ces molécules sont toutes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine (**Van Beynum et al., 2005 ; Hao et al.,**

2007).

2-2-3-Les facteurs génétiques

Des anomalies des gènes codants pour les enzymes impliquées dans le cycle de l'homocystéine peuvent être responsables d'une hyperhomocystéinémie. Il s'agit principalement des polymorphismes des gènes :

- MTHFR C677T et A1298C avec substitution de l'acide aminé alanine en valine pour la première mutation, et de l'acide aminé glutamate en alanine pour la deuxième mutation (**Abdessemed *et al.*, 2009 ; Cortex et Motti, 2009**).
- MTR A2756G avec substitution de l'acide aminé aspartate par une glycine (**Harmon *et al.*, 1999**)
- CBS T833C et G919A (**Buyscharet et Hermans, 2003**)
- TCN C776G avec remplacement de l'acide aminé arginine au profit d'une proline (**Namour *et al.*, 2001**).

3-Pathogénicité de l'homocystéine

Les désordres du métabolisme aboutissant à un excès d'homocystéine sont associés à de nombreux risques pathogènes (**Guilland, 2003**). En effet, la majorité des études cliniques et épidémiologiques chez l'homme et des modèles animaux a montré qu'une élévation des taux plasmatiques en homocystéine est associée à l'apparition de diverses pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, parkinson) et l'ensemble des maladies occlusives artérielles incluant les pathologies cérébrovasculaires, les cardiopathies ischémiques et les atteintes artérielles périphériques (**Aubard *et al.*, 2000 ; Blandini *et al.*, 2001 ; Heider *et al.*, 2004 ; Sharma *et al.*, 2007**).

Les mécanismes d'altération des vaisseaux liés à l'homocystéine sont encore imparfaitement connus. Cependant, les expérimentations animales ont permis d'apporter certaines précisions. L'action se situe au niveau de la paroi des vaisseaux avec surtout une altération de l'endothélium (**Aubard *et al.*, 2000**). Il existe de plus une prolifération des cellules musculaires lisses, une peroxydation lipidique, une synthèse de collagène et un épaissement de la matrice extracellulaire avec une dégradation du matériau élastique de la paroi artérielle (**Aubard *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2002 ; Tsai, 1994**).

Ces lésions pourraient résulter d'un effet direct de l'homocystéine. En effet, l'auto-oxydation

des résidus thiols de la molécule d'homocystéine libère des ions peroxydes (radicaux libres), capables d'altérer la structure et le métabolisme cellulaire. Ces effets délétères liés aux radicaux libres s'exercent sur les cellules endothéliales vasculaires (**Aubard *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2001 ; Cook *et al.*, 2002**).

4-Le statut oxydant en hyperhomocystéinémie

L'homocystéine est un acide aminé soufré qui possède un groupement thiol réducteur, possède paradoxalement des propriétés pro-oxydantes (**Guilland *et al.*, 2003**).

L'effet pro-oxydant de l'homocystéine peut être expliqué par un mécanisme appelé « eNOS uncoupling » (**Pritchard *et al.*, 1995 ; Zhao *et al.*, 2003**). Brièvement, l'homocystéine fait que eNOS devient la source majeure de l'anion superoxyde (O_2^-) suite à un transfert d'électrons sur l'oxygène et non sur la L-arginine (**Beaudeau, 2006**). L' O_2^- inactive rapidement l'oxide nitrique (NO), conduisant à la formation de fortes concentrations de peroxyde nitrique (ONOO⁻), un oxydant très puissant et toxique (**Pritchard *et al.*, 1995 ; Patel *et al.*, 2000 ; Zhao *et al.*, 2003 ; Duranteau, 2008**).

Un autre mécanisme potentiel de l'accumulation de l'anion superoxyde (O_2^-) en présence d'homocystéine est l'inhibition de la production de NO provoquée par le diméthylarginine asymétrique (ADMA), inhibiteur endogène de l'eNOS. Dans un modèle animal avec de l'homocystéine, il a été montré une élévation plasmatique d'ADMA. Quand l'endothélium est exposé à l'homocystéine ou à son précurseur, la méthionine, la concentration d'ADMA dans le milieu de culture augmente de manière dose-et temps dépendante, et est corrélée avec une diminution de la synthèse de NO (**Corson *et al.*, 1996 ; Boger, 2000 ; Sydow et Munzel, 2003**).

Un autre mécanisme possible du stress oxydant induit par l'homocystéine est la perturbation de la fonction de deux enzymes antioxydantes : superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPx) (**Akchiche, 2009**). La SOD est une enzyme catalysant la réduction de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (**Huang *et al.*, 2001**). Il est rapporté que le niveau d'homocystéine plasmatique est corrélé avec une augmentation de SOD extracellulaire chez les patients avec homocystinurie et chez les patients atteints d'une hyperhomocystéinémie modérée (**Wang *et al.*, 1999 ; Wilcken *et al.*, 2000**). Cet effet est probablement causé par la diminution de liaison de la SOD extracellulaire avec la surface de la cellule endothéliale, parce que l'homocystéine pourrait altérer la surface de la protéoglycane héparane sulfate. Cet effet pourrait conduire à une perte de sa capacité à protéger la surface endothéliale contre le stress oxydant (**Yamamoto *et al.*, 2000 ; Underti, 2003**).

Des résultats montrent que l'homocystéine entraîne une baisse des ARN messagers et de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans les cellules endothéliales bovines de l'aorte (**Cook et al., 2002**). La GPx catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) par oxydation du glutathion (GSH) en glutathion réduit (GSSG) (**Chen, 2009**). L'inhibition de l'activité de la GPx par l'homocystéine est l'un des mécanismes où l'homocystéine produit une toxicité vasculaire, et c'est une caractéristique et une propriété qui ne se trouve et n'existe dans aucun thiol biologique. Cette raison montre que la cystéine, un acide aminé présent dans le plasma avec une concentration plus importante que l'homocystéine, peut produire l' O_2^- durant l'auto-oxydation, mais ne donne pas une toxicité, tout simplement parce que la cystéine ne peut pas inhiber la formation et l'activité de la GPx (**Underti, 2003**).

5-Traitement de l'hyperhomocystéinémie

Suite aux multiples pathogénicités de l'hyperhomocystéinémie, il est logique d'envisager et d'établir l'intérêt d'une intervention pharmacologique et thérapeutique. Plusieurs protocoles de vitaminothérapie à base d'acide folique seul ou associé ont fait leurs preuves pour réduire l'homocystéine chez des patients coronariens présentant une hyperhomocystéinémie (**Moat et al., 2004**). De nombreuses variations de doses ont été proposées sans qu'il soit possible à l'heure actuelle de définir la dose optimale (**Aubard et al., 2000**). Jacques et coll. démontrent l'efficacité d'un enrichissement diététique en folate dès la dose de $140\mu g/100g$ de produits céréaliers. Cet enrichissement de l'alimentation en folates réduit la prévalence de l'hyperhomocystéinémie de 18,7 à 9,87 (**Buyscharet et Hermans, 2003**).

Chez des patients atteints d'homocystinurie, le traitement par la vitamine B6 a fait la preuve de son efficacité, il permet de diminuer les taux d'homocystéine de 50% et le nombre d'accidents vasculaires. Les apports en vitamine B12 permettent d'obtenir une réponse chez des sujets pyridoxino-résistants (**Aubard et al., 2000**).

De nombreux facteurs environnementaux peuvent influencer le statut en vitamines B : plus d'exercice physique, diminution du tabagisme et de la consommation d'alcool... etc. De plus, un changement des habitudes alimentaires dans le sens d'une réduction de la consommation de produits manufacturés à faible teneur en micronutriments au profit d'aliments riches en vitamines B (légumes et certains produits animaux) doit permettre- entre autres- de réduire l'homocystéine dans la population générale (**Broekmans et al., 2000**).

Les lésions liées à l'hyperhomocystéinémie, comme nous l'avons vu, seraient médiées par le stress oxydant. Ainsi, les inhibiteurs des radicaux libres comme la vitamine C et la vitamine E pourraient avoir un intérêt pour prévenir l'apparition des troubles (**Aubard et al., 2000**).

Chapitre 3 : Les gastéropodes

« Les escargots »

1-Etymologie du mot « escargot »

Le mot espagnol « caracol » est probablement à l'origine du mot français « escargot », ainsi introduit en France via la Rochelle où les marins espagnols et portugais venaient se ravitailler.

A cette appellation, il faut ajouter d'autres noms tels que : « hélice » (par référence à la forme de sa coquille) ou « colimaçon ». On désigne également l'escargot différemment selon les régions. A titre d'exemple « carago » (l'escargot de Marseille), « cantareu » (l'escargot de Nice), « Luma » (l'escargot de Poitou) ... etc. (**Bonnet et al., 1990**).

Sur 400 espèces d'escargots vivant à l'état naturel, il n'y a que six qui font l'objet de transactions commerciales importantes :

- L'escargot de Bourgogne (*Helix pomatia*).
- L'escargot Petit-Gris (*Helix aspersa aspersa* ou Müller).
- L'escargot Gros-Gris (*Helix aspersa maxima*).
- L'escargot Tapadou ou Apatelli (*Helix aperta*).
- La mourguette (*Eobonia vermiculata*).
- L'escargot Turc (*Helix lucorum*).

Dans notre étude, nous allons prendre pour modèle l'escargot : Petit-Gris : *Helix aspersa*

2-Classification

L'escargot appartient à l'embranchement des mollusques, animaux à corps mou et dépourvu de squelette. Sa masse viscérale présente une torsion de 180 par rapport au pied, ce qui engendre une asymétrie plus ou moins prononcée de certains de ses organes. Cette particularité anatomique le place dans la classe des gastéropodes. L'escargot possède un poumon (ou cavité palléale) ce qui le situe dans la sous-classe des pulmonés. Il appartient au sous-ordre des Stylommatophores caractérisés par le port des yeux à l'extrémité des tentacules oculaires. La forme de sa coquille enroulée caractérise la superfamille des Helicacea ; il appartient à la famille des Hélicidés. Cette famille contient plusieurs genres d'escargots dont *Helix aspersa* (Petit-Gris) (**Bonnet et al., 1990 ; Pirame, 2003**).

3-*Helix aspersa* Müller (Petit-Gris) -Distribution géographique

L'escargot « petit-gris », *Helix aspersa*, est une espèce adaptée à un climat de type océanique ou de type méditerranéen. On le trouve sur une grande partie du territoire français, mais sa présence est plus importante dans les régions littorales. On le rencontre également en

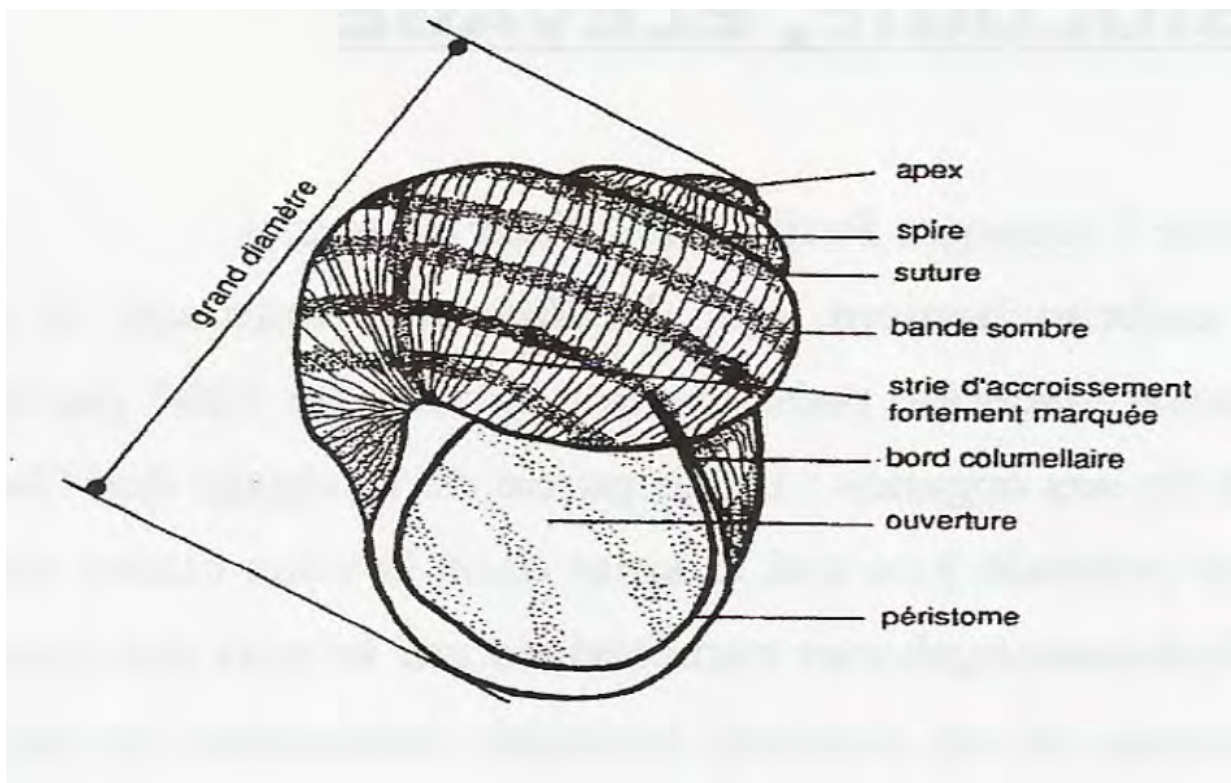


Figure 4 : Coquille de l'escargot « Petit-Gris » (Bonnet *et al.*, 1999)

Grande-Bretagne, en Espagne et dans tout le bassin méditerranéen. Son diamètre varie de 30 à 40mm pour un poids vif adulte se situant entre 6 et 15g (**Bonnet *et al.*, 1990**).

4-Description morphologique et anatomique de l'escargot « Petit-Gris »

L'escargot possède une coquille pouvant contenir tout le corps de l'animal. Lorsqu'il est en extension, seul le pied apparait, la masse viscérale étant retenue dans la coquille par le muscle columellaire (**Bonnet *et al.*, 1990 ; Pirame, 2003**).

4-1-La coquille

La coquille du Petit-Gris est plus globuleuse que les autres espèces du genre *Helix*, elle est de couleur brune avec des dessins foncés dont la forme varie selon l'origine. Elle s'enroule autour d'un axe central appelé columelle, dans le sens des aiguilles d'une montre (Fig.4). Du point de vue de sa constitution, elle est composée d'une partie organique et d'une partie minérale. La partie organique (1 à 2% de sa composition) est une trame protéique externe : la conchyoline (protéine caractéristique des mollusques). La partie minérale représente 98 à 99% de la coquille. Il s'agit de carbonate de calcium sous forme de calcite et d'aragonite qui imprègnent la trame de conchyoline. La coquille est sécrétée par le bord du manteau. La trame de conchyoline est d'abord élaborée, donnant un aspect mou et fragile. Cette trame est ensuite renforcée par des couches successives de carbonate de calcium. A la fin de sa croissance, le bord de la coquille appelé péristome, se retourne et se durcit. L'escargot a terminé sa croissance : il est « bordé ». La coquille présente des stries d'accroissement perpendiculaires au sens de sa croissance. Les stries les plus prononcées caractérisent des arrêts de croissance dus à l'estivation et à l'hibernation. La coquille de l'escargot représente environ le tiers de son poids frais total (**Bonnet *et al.*, 1990**).

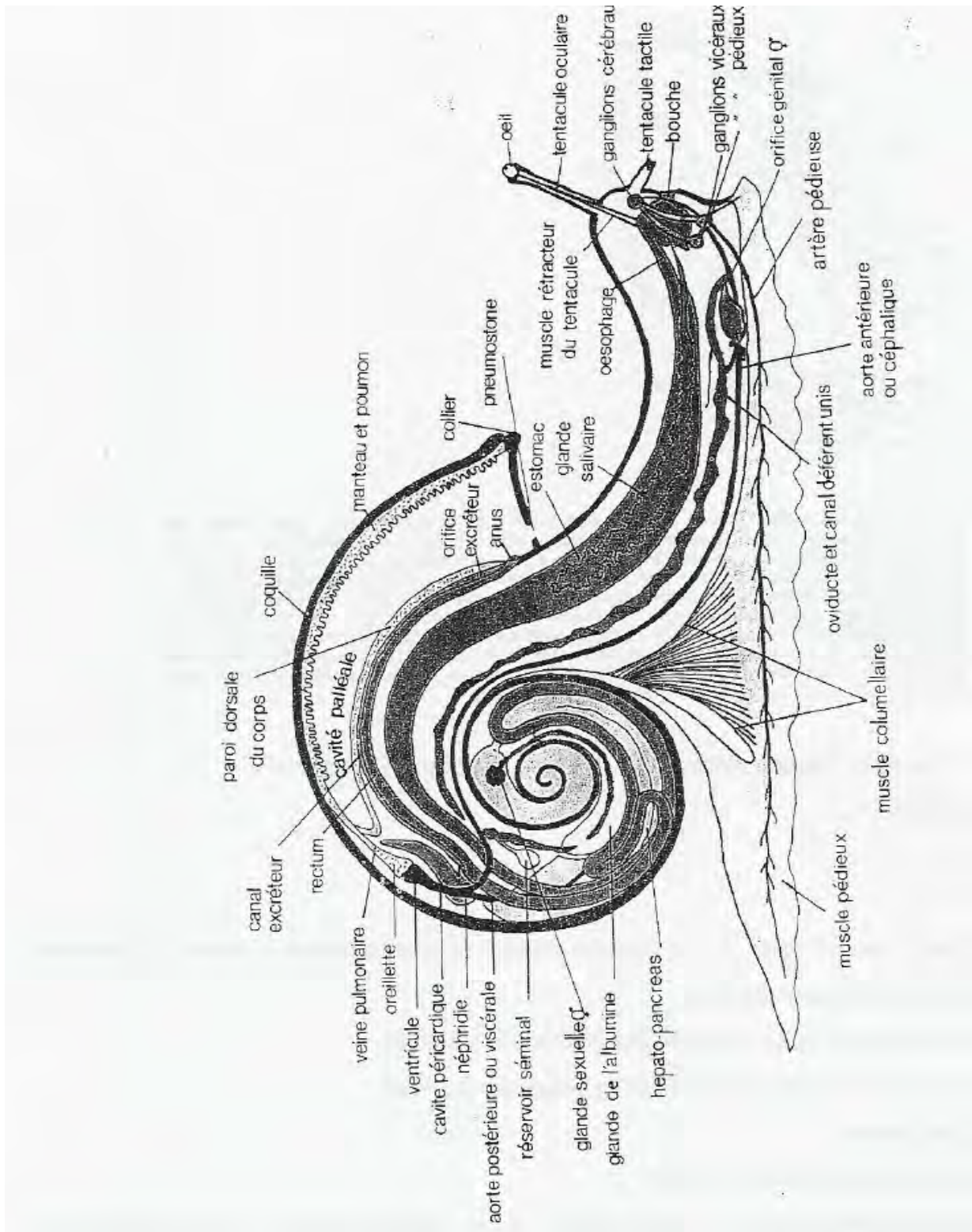


Figure 5: Schéma de l'anatomie interne de l'escargot (Bonnet *et al.*, 1999)

4-2-Le corps

Le corps comprend une partie renfermée dans la coquille et une partie visible chez l'animal en extension. Cette dernière est une masse musculaire dont la fonction essentiellement est locomotrice, le pied (**Bonnet et al., 1990**). L'escargot se déplace par réptation sur la sole pédieuse recouverte d'un abondant mucus. La partie antérieure du pied, communément appelé la tête, comprend :

- Une bouche munie d'une lèvre supérieure, une lèvre inférieure et deux lèvres latérales,
- Deux tentacules oculaires portant chacun à leur extrémité un œil,
- Deux tentacules tactiles,
- Un orifice génital situé sur le côté droit de la tête (**Bonnet et al., 1990 ; Pirame, 2003**).

La partie contenue dans la coquille s'appelle le tortillon. Il s'agit d'une masse viscérale comprenant plusieurs zones visibles sur un animal décoquillé. La partie antérieure de cette masse est le manteau. C'est une poche richement vascularisée ayant une fonction essentiellement respiratoire. La partie du manteau en contact avec le péristome forme un renflement :

Le bourrelet palléal. Sur le bord inférieur de ce bourrelet s'ouvrent trois orifices : l'anus, l'orifice excréteur et le pneumostome. Le pneumostome communique directement avec la cavité palléale ou poumon, il agit comme un diaphragme permettant le passage ou la rétention de l'air. En arrière du poumon se trouve un rein de couleur jaunâtre ou organe de Bojanus et un cœur comprenant un ventricule et une oreillette. La partie postérieure la plus sombre du tortillon s'appelle la glande digestive ou hépatopancréas. Son rôle est comparable à celui du foie chez les vertébrés. Sur l'hépatopancréas, on distingue une zone blanchâtre : la glande de l'albumine (**Bonnet et al., 1990 ; Pirame, 2003**) (Fig.5).

5-Ecophysiologie du Petit-Gris

L'approche écophysiologique de l'escargot permet de comprendre sa physiologie en relation avec les facteurs environnementaux. Cette démarche a permis de définir les éléments influençant ses grandes fonctions : la reproduction et la croissance. L'escargot présente des phases d'activité et d'inactivité saisonnières et journalières (**Bonnet et al., 1990**).

5-1-Activité saisonnière

Comme tous les mollusques, l'escargot est un poïkilotherme : il ne peut réguler sa température corporelle. Dans des conditions de climat tempéré ou continental, il s'est adapté aux variations thermiques saisonnières en développant des rythmes d'activité annuels marqués par trois états

physiologiques (**Bonnet *et al.*, 1990 ; Pirame, 2003**) :

-L'un se caractérise par un ralentissement du métabolisme et intervient lors des basses températures hivernales : c'est l'hibernation,

-L'autre s'étend entre le printemps et l'automne. Il se caractérise par une reprise de l'activité locomotrice, le déclenchement de la croissance des jeunes et la reproduction des adultes,

-Le troisième état est durant les périodes sèches et chaudes, l'escargot présentera également une vie de ralentie, appelée estivation. Contrairement à l'hibernation, l'estivation est un état de résistance ponctuel qui disparaît lorsque les conditions thermohygrométriques deviennent propices à l'activité.

En début d'hibernation, l'escargot sécrète un voile muqueux appelé épiphragme qui vient obturer l'ouverture de sa coquille. Cet épiphragme limite les pertes en eau qui atteignent cependant 30% du poids frais de l'animal (**Bonnet *et al.*, 1990 ; Pirame, 2003**). L'escargot hibernant est donc relativement déshydraté, d'où son aspect recroquevillé au fond de sa coquille. Un animal peut sécréter plusieurs épiphragme successifs (2 à 5). Les échanges gazeux avec l'extérieur restent possibles grâce à une zone blanchâtre, sur l'épiphragme, riche en carbonate de calcium. La perte en eau au début de l'hibernation a pour effet d'augmenter la viscosité de l'hémolymphe induisant un ralentissement du rythme cardiaque (**Bonnet *et al.*, 1990**).

Il a été montré qu'en plus de la température, l'activité saisonnière de l'escargot est réglée par la photopériode. Le seuil photopériodique d'activité chez l'escargot « petit-gris » se situe aux environs de 15 heures (15 H) de photophase (phase d'éclairement continu par jour). Une photophase inférieure à 15H induit l'inactivité et ceci indépendamment de la température et de l'hygrométrie. Une photophase supérieure à 15H de lumière stimule l'activité, notamment la croissance et la reproduction (**Bonnet *et al.*, 1990 ; Ansart *et al.*, 2001**).

5-2-Reproduction et croissance

Les escargots aptes à s'accoupler sont matures et généralement « bordés ». Dans la nature, ils sont alors âgés de 2 à 3 ans. Leur croissance est caractérisée soit par le gain de poids frais (poids de l'animal vivant avec sa coquille), soit par l'évolution du grand diamètre de la coquille, ces deux paramètres sont corrélés (**Bonnet *et al.*, 1990 ; Pirame, 2003**).

La croissance de la coquille a lieu au niveau du bourrelet palléal et s'effectue en deux dimensions, d'une part un allongement et un enroulement spiral autour de l'axe columellaire et, d'autre part, par un épaissement calcique. La reproduction et la croissance des escargots sont dépendantes des facteurs du milieu environnant : la lumière, la température et l'hygrométrie,

mais aussi de l'origine des animaux (sauvages « la nature » ou domestiques « élevage »). Il a été démontré que la reproduction et la croissance sont stimulées par des photopériodes de type « jour long », et inhibées par des photopériodes de type « jour court » (photophase <15H).

D'autre part, on a remarqué que dans des conditions de température supérieure à 30C° et en l'absence d'humidité ambiante, l'activité journalière se trouve inhibée ainsi que les capacités de reproduction et de croissance (**Bonnet et al., 1990**).

Par ailleurs, l'influence de la période et la durée de l'hibernation a été mise en évidence. Au-delà de trois mois, la durée d'hibernation a un impact différent sur la reproduction selon que les escargots hibernent en hiver ou en été. Après une hibernation estivale, les escargots se reproduisent au moins deux fois plus qu'après une hibernation hivernale (**Bonnet et al., 1990**).

5-3-Prédation-Parasitisme

5-3-1-Principaux prédateurs

Les escargots sont un élément important des réseaux trophiques. Ils ont de nombreux prédateurs vertébrés et invertébrés. Le principal prédateur est l'homme, grand consommateur d'escargots. On estime à environ 15 à 20000 tonnes le ramassage annuel sur le territoire français. De plus, l'action de l'homme sur l'environnement, telle que l'utilisation de pesticides, l'arrachement des haies, contribue à amplifier la disparition des escargots dans le milieu naturel (**Bonnet et al., 1990 ; Pirame, 2003**).

Les autres mammifères connus comme prédateurs de l'escargot se rencontrent parmi les rongeurs et les insectivores, tels que les souris, les mulots, les rats, les hérissons, les musaraignes et les taupes. Certains oiseaux sont également prédateurs d'escargots comme les merles et les grives. Des reptiles et batraciens tels que la couleuvre, l'orvet et les tritons consomment des escargots bien que ce ne soit pas l'essentiel de leur régime alimentaire (**Bonnet et al., 1990 ; Pirame, 2003**).

Comme les vertébrés, de nombreux invertébrés se nourrissent d'escargots, ce sont principalement les insectes coléoptères.

5-3-2-Principaux parasites

Par opposition aux prédateurs qui tuent leur proie et les consomment, les parasites vivent aux dépens de leur hôte sans le tuer. On distingue les ectoparasites qui vivent sur l'animal comme les acariens piqueurs, et les endoparasites qui s'introduisent dans l'organisme tels que les vers parasites qui appartiennent à la classe des nématodes (**Bonnet et al., 1990 ; Pirame, 2003**).

6-Qualité nutritionnelle des escargots

La valeur nutritionnelle de l'escargot est remarquable. Elle est presque comparable à celle du poisson. L'escargot est aussi riche en protéine et en eau que les viandes rouges et très pauvre en graisse saturées d'où son caractère diététique. De plus, certains minéraux et oligoéléments y sont présents en quantités très intéressantes. Il s'agit notamment du calcium, du magnésium, du phosphore, du fer, du cuivre et des vitamines (B6, B12 et C) (**Gomot, 1998**). La grande importance de l'escargot dans le régime alimentaire a laissé suggérer qu'il a une incidence sur le développement de quelques pathologies. Ainsi, il a été démontré que les plantes dont se nourrissent les escargots sont riches en acide α -linoléique. Cet acide aurait des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires (**Bonnemain, 2005**).

7-Utilisation de l'escargot par l'homme

En raison de ses propriétés écophysiologiques et ses qualités nutritionnelles, l'escargot est largement utilisé par l'homme dans de nombreux domaines tels que la cuisine et la détection de pollution. Comme le ver de terre, l'escargot a la particularité de concentrer dans ses tissus les substances chimiques présentes dans le sol, l'air et les plantes de son environnement. Ce sont des éléments métalliques (MTE) comme le cadmium, le plomb, le zinc, le cuivre, le mercure et l'arsenic (**Beeby et Richmond, 1989 ; De Vaufleury et al., 2009**). Cette propriété caractéristique des escargots permet de les utiliser comme des biomarqueurs cellulaires (bio-indicateurs) de l'écotoxicologie : en observant ce qui est accumulé dans l'organisme de l'escargot, on peut donc savoir si un sol est pollué mais également évaluer la quantité de polluants susceptibles de se disperser dans la nature et de contaminer les êtres vivants ; et d'avoir des informations très utiles pour tester les pesticides (en agriculture) et qu'il serait impossible d'obtenir avec une méthode classique d'analyse du sol.

En médecine, les escargots ont été très utilisés depuis l'Antiquité. On les retrouve jusqu'à aujourd'hui dans certaines spécialités pharmaceutiques et ils sont encore l'objet de nombreuses études. Quelques pharmacies célèbres comme Mure, Figuiet et Baron-Barthélémy ont mis en point des spécialités réputées tout au long du XIX^{ème} siècle, comme l'atteste le Dorvault de 1877. Mais l'histoire des escargots en médecine se poursuit au XX^{ème} siècle avec l'hélicidine, commercialisée en France en 1957, et avec l'HPA (Helix Pomatia Lectin) qui se fixe sur les tissus métastatiques (**Bonnemain, 2003**).

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1-Matériel biologique

1-1-Les escargots

L'étude a été réalisée sur des escargots élevés *Helix aspersa* à l'âge adulte provenant de la wilaya de Mila le mois de mai et ayant un poids moyen de 7 à 8 gr (sans coquille) pour l'escargot ; cette espèce est choisie pour les raisons suivantes :

- Large répartition géographique en Algérie ;
- Leurs effets thérapeutiques sont peu connus ;
- Les escargots élevés sont moins toxiques par rapport aux escargots provenant de la nature (les escargots naturels sont des vecteurs de contamination).

1-2-Les rats

Nous avons utilisé des rats Wistar provenant de l'élevage : mâles, adultes, sains et ayant un poids qui varie entre 200 et 260 gr (poids idéal).

Le choix de ce modèle animal (rats mâles Wistar Albinos) est basé sur les raisons suivantes :

- Les rats sont des animaux dociles et faciles à manipuler et à entretenir ;
- Ils sont moins agressifs que les autres modèles animaux ;
- Ils sont résistants aux diverses contaminations ;
- C'est le modèle animal cité par la littérature et utilisé dans des études similaires.

1-3-Les microorganismes utilisés

Le choix des microorganismes a été porté sur des souches fréquentes en pathologie humaine. Nous avons sélectionné trois souches bactériennes de coloration Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 13 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) ; deux souches fongiques (*Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74 et *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92) et une souche levurienne (*Candida albicans* UMIP 88465).

2-Méthodes

2-1-Évaluation de l'activité antioxydante de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* chez le rat

2-1-1-Préparation de l'homogénat des escargots

Les escargots sont d'abord nettoyés à l'eau propre, puis extraits de leurs coquilles et ensuite débarrassés de leurs baves ; l'hépatopancréas, l'intestin et le cœur sont ensuite enlevés, il ne reste que la chair ; cette dernière est lavée doucement par un tampon phosphate (pH = 7,2) pour éviter la perte d'eau et des protéines. Ensuite, la chair est séchée sur un papier absorbant puis coupée en petits morceaux pour faciliter l'homogénéisation. L'homogénat préparé est distribué dans des tubes Eppendorf et conservé au congélateur (-30C°) jusqu'à l'utilisation (**Ramos-Vasconcelos et al., 2005**).

2-1-2-Traitement des rats

Les rats (Albinos Wistar mâle) sont répartis en 3 lots expérimentaux de 7 rats chacun ; cette répartition s'est faite selon l'homogénéité de leurs poids et leurs âges. Ils sont mis dans des cages en plastique munies chacune d'un couvercle, d'une mangeoire, d'une bouteille d'eau minérale et d'une étiquette où sont mentionnés le nom du lot, le traitement subi ainsi que la date du début de chaque expérience.

Les cages doivent être nettoyées chaque jour pendant toute la durée de l'expérimentation, la litière utilisée est la sciure de bois.

Pour l'identification, les rats sont marqués quotidiennement par des marqueurs colorés pendant la durée de l'expérimentation.

Les rats sont répartis en trois lots :

-1^{er} lot: lot contrôle « C »;

-2^{ème} lot: lot traité avec une dose élevée de la L- Méthionine « M »;

-3^{ème} lot: lot traité par une dose élevée de la L- Méthionine associée à l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* « MHE ».

Les animaux sont pesés quotidiennement à la même heure depuis le début du traitement jusqu'à la fin ; le poids moyen de chaque animal est calculé chaque fin de semaine.

Également, pour suivre l'évolution du poids de l'animal en fonction de l'alimentation, la quantité de l'aliment consommé est enregistrée quotidiennement et la moyenne est calculée chaque fin de semaine.

L'alimentation standard est composée de protéines, matière grasse, cellulose, magnésium, calcium ; phosphore, vitamines A, D3, et E et d'oligoéléments (fer, cuivre, sélénium, zinc, cobalt, iode et manganèse).

L'eau minérale standard est composée de (en mg/l) : 89,95 de calcium, 34,05 de magnésium, 0,99 de potassium, 47,25 de sodium, 231,8 de bicarbonate, 188 de sulfates, 65 de chlorure, 2,53 de nitrates, <0,01 de nitrites et 588 de résidu sec à 180C°, pH= 7,77.

Pour étudier l'effet antioxydant de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* nous avons procédé par deux expériences ; la première consiste à évaluer l'effet oxydant de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat, la deuxième a pour objectif la mise en évidence de l'effet antioxydant de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa*.

Les doses utilisées sont choisies comme suit :

- Dose de la L-Méthionine: 400 mg/kg de poids du rat/jour (**Sharma et al., 2007**).
- Dose de l'homogénat d'*Helix aspersa*: 100 mg/kg de poids du rat/jour (**Pons et al., 1999**).

Expérience I: Action de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat

La quantité de la méthionine donnée (400 mg/kg du poids de rat/jour) est mélangée avec la farine et l'eau minérale pour former de petites boulettes administrées par voie orale aux animaux du 2^{ème} lot (lot M : méthionine). Ce lot est confronté au lot contrôle (lot C) recevant le régime standard (200g d'aliment + 500ml d'eau minérale chaque jour).

La durée du traitement est de 6 semaines.

NB

Il faut tenir en compte la quantité de la méthionine contenue dans l'aliment: 200g de l'aliment contient 4,5mg de méthionine.

Expérience II: Effet de l'homogénat d'*Helix aspersa* associé au traitement de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat

Cette expérience correspond au 3^{ème} lot, les rats de ce lot reçoivent la même quantité de la méthionine que ceux du 2^{ème} lot (400 mg/kg de poids du rat/jour) + 100 mg d'homogénat d'escargots/kg de poids du rat/jour. La méthionine et l'homogénat d'escargots sont préparés sous forme de boulettes en les mélangeant avec la farine et l'eau minérale. Ce lot est désigné par MHE (méthionine + homogénat de l'escargot *Helix aspersa*) ; il est confronté au 2^{ème} lot pour voir l'effet antioxydant de l'homogénat d'escargots sur les rats traités par la L-Méthionine.

La durée du traitement est de 6 semaines.

Après la durée du traitement, un prélèvement sanguin est réalisé au niveau des sinus caverneux du rat. Un capillaire (très fin) est introduit dans le sinus, et un volume de 2,5 à 3ml de sang est

collecté dans un tube EDTA pour le dosage plasmatique du MDA et des protéines totales.

Les tubes sont légèrement mélangés pour incorporer l'anticoagulant, puis centrifugés (centrifugeuse: Hettich EBA8S) pendant 10 minutes à 5000 tours/min. Le plasma est ensuite collecté et distribué dans des tubes Eppendorf étiquetés, puis conservé au congélateur à -30°C jusqu'à l'utilisation.

Après les prélèvements sanguins, les animaux sont anesthésiés au chloroforme, maintenus vivants, une dissection est réalisée suivie par un prélèvement du foie pour le dosage du MDA et des protéines totales.

2-1-3-Dosage du MDA et des protéines totales

2-1-3-1-Dosages plasmatiques

2-1-3-1-1-Dosage du MDA plasmatique

La principale source du malonalaldéhyde (MDA) est la peroxydation des acides gras insaturés.

Le dosage du MDA repose sur sa réactivité avec l'acide thiobarbiturique. En effet, deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) se fixent sur une molécule de MDA, en milieu acide et à 100°C pour donner un conjugué coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

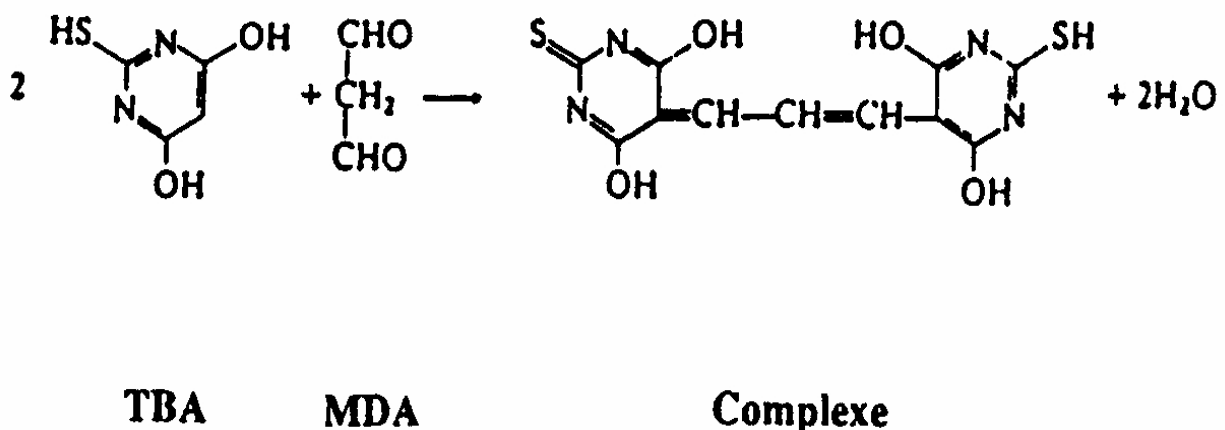


Figure 6 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique

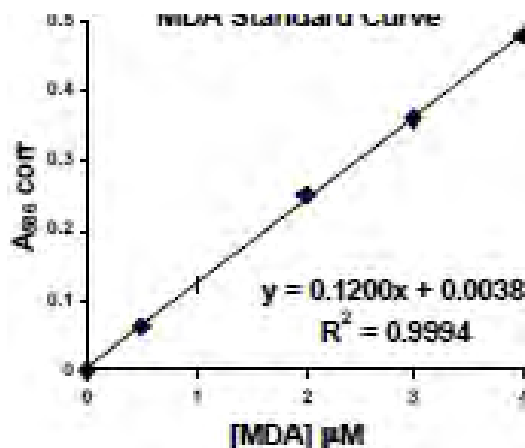


Figure 7 : Courbe étalon du MDA

▲ Mode opératoire

Un volume de 2,5 ml de TCA à 20% est dilué dans une solution de HCl à 0,6 mol/l, le tout est mélangé avec 0,5 ml de plasma dans un tube à essai, et homogénéisé par le vortex. Après 10 minutes, un volume de 2,5 ml de TBA à 0,67% dilué dans une solution de NaOH à 10% est ajouté.

Le mélange est chauffé à 100 C° pendant 20 minutes au bain-marie ; après refroidissement, un volume de 4 ml de n-butanol est additionné.

Une centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/min est effectuée ; la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm. L'activité du MDA est exprimée en µM/mg de protéines/ml de plasma (Lefèvre *et al.*, 1998).

2-1-3-1-2-Dosage des protéines totales plasmatiques

Le dosage des protéines totales plasmatiques se fait selon la technique de Bradford (1976) utilisant le bleu de Comassie. Après fixation du colorant sur les protéines, le maximum de son absorption se déplace de 465 à 595 nm ; c'est l'augmentation de l'absorption à 595 nm qui est mesurée par cette technique (Osea da Silva et Zezzi Arruda, 2006).

Cette technique est rapide et reproductible ; la coloration est stable pendant une heure.

▲ Préparation de la gamme étalon

La quantité de protéines de l'échantillon est déterminée par référence à une courbe étalon établie avec le sérum bovine albumine (BSA) ; chaque dosage est réalisé dans une cuve de spectrophotomètre comme suit:

Tableau 1: Données des concentrations du BSA pour établir une gamme étalon

BSA en μ l	0	125	250	375	500	625	750
Eau distillée en μ l	750	625	500	375	250	125	0
Réactif de Bradford en ml	2	2	2	2	2	2	2

Les préparations du réactif de Bradford et du BSA sont mentionnées dans l'annexe 1.

- Homogénéiser par renversement des tubes ou au vortex ;
- Laisser reposer 5 minutes jusqu'à la stabilisation de la coloration ;
- 1^{ère} lecture spectrophotométrique à 595 nm ;
- Incubation pendant 1 heure jusqu'à la stabilisation complète de la coloration ;
- 2^{ème} lecture spectrophotométrique à 595 nm.

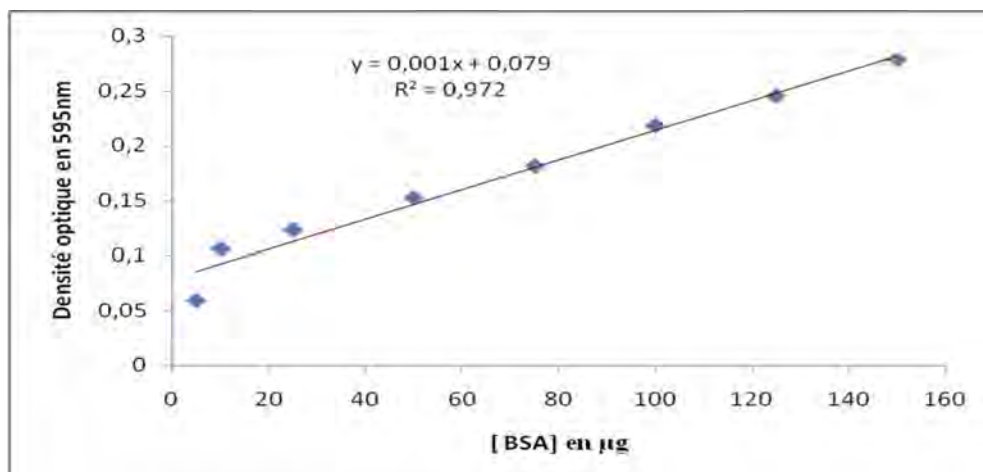


Figure 8 : Courbe étalon des protéines totales

- **Détermination de la concentration des protéines totales plasmatiques**

Pour choisir le volume de chaque test, nous avons fait différentes dilutions du plasma témoin d'un rat : 25µl, 50µl, 125µl, 250µl.

Nous avons choisi le volume de 125 µl comme volume de chaque test par rapport à tous les lots. La concentration des protéines totales plasmatiques est exprimée mg/ml.

2-1-3-2-Dosages tissulaires

Le dosage du MDA et des protéines totales tissulaires est effectué sur des fractions cytosoliques à partir des fragments du foie congelé à -30 C°.

Préparation des fractions cytosoliques (Iqbal *et al.*, 2003)

- ^ Prendre 1 g de foie et additionner 3 volumes du tampon phosphate glacé de 0,1M (pH = 7,4) contenant 1,17% de KCl ;
- Broyer par un homogénéiseur d'Ultra Turax ;
- Mettre l'homogénat dans des tubes secs identifiés et centrifuger à 2000 tours/min pendant 15 minutes à 4C° ;
- Filtrer les débris et récupérer le surnageant dans des tubes Eppendorf ;
- Centrifuger le surnageant à 9600 tours/min pendant 30 minutes à 4C° ; les fractions cytosoliques sont obtenues finalement.

2-1-3-2-1-Dosage du MDA tissulaire

Le mode opératoire du dosage du MDA tissulaire est le même que celui du MDA plasmatique, la seule différence réside dans le volume du n-butanol qu'on additionne après le refroidissement, dans ce cas c'est 2 ml. L'activité du MDA est exprimée en µM/mg de protéines/gr de tissu.

2-1-3-2-2-Dosage des protéines totales tissulaires

Nous avons pris le volume de 125 µl de fraction cytosolique comme volume de chaque test pour tous les lots. La concentration des protéines totales hépatiques est exprimée en mg/g de tissu.

2-2-Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'escargot *Helix aspersa*

Cette étude réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie appliquée et Génie microbiologique a été menée selon les trois étapes suivantes :

2-2-1-Préparation des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa*

La préparation des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa* se fait à partir de l'homogénéat préparé auparavant (dans ce cas l'homogénéat est exploité à l'état frais).

L'homogénéat obtenu est formé de deux phases d'aspects différents :

La première phase ; semi solide, formée d'une masse importante de la chair avec ses débris muqueux.

La deuxième phase ; liquide, formée des inclusions liquides de la chair dans laquelle est noyée la phase solide.

Dans le but de choisir le meilleur solvant d'extraction, trois solvants de polarité différente ont été utilisés : le n-Hexane, le méthanol et l'eau distillée.

L'homogénéat est réparti en trois parties de volume presque égal. Chaque partie est mise dans l'un des trois solvants cités précédemment. Les trois mélanges sont ensuite broyés afin d'assurer leur homogénéisation ; les extraits organiques bruts sont obtenus.

2-2-2-Mise en culture des souches cliniques bactériennes, fongiques et celle de la souche levurienne *Candida albicans* UMIP 88465

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques bruts des gastéropodes a été réalisée par la méthode des disques en papier. Cette activité a été testée vis-à-vis des bactéries tests provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, et *Pseudomonas aeruginosa* 13 (fournie par le laboratoire de microbiologie de la clinique rénale, Daksi-Constantine), ainsi que des souches fongiques provenant de la collection de l'institut Pasteur : *Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74, *Trichophytum rubrum* CIP 2043.92, et la souche levurienne *Candida albicans* UMIP 88465.

Pour chaque souche bactérienne et pour la levure *Candida albicans* UMIP 88465, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18 heures sur le milieu de culture TSA « Trypticase Soy Agar » (institut Pasteur) pour les bactéries, et sur le milieu Sabouraud (Institut Pasteur) pour la levure. La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans de

l'eau physiologique stérile, et en comparaison avec la solution Mc Farland de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC / ML.

Pour les deux souches fongiques : *Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74 et *Trichophytum rubrum* CIP 2043.92, une culture de 48 heures a été réalisée sur le milieu Sabouraud (Institut Pasteur) par la technique d'ensemencement par touche.

2-2-3-Mise en évidence de l'activité antibactérienne, antifongique et anticantidale des différents extraits organiques (méthode des disques en papier)

Des disques stériles non imprégnés de 6 mm de diamètre préparés à partir du papier Wathman N° 4 reçoivent 150 µL des extraits méthanoliques, hexanoïques, et l'extrait préparé dans de l'eau distillée. Des disques témoins reçoivent 150 µL des différents solvants purs. Après séchage sous courant d'air chaud, les disques sont déposés sur les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par la technique d'écouvillonnage (selon la technique de la NCCLS –National Committee for Clinical Laboratory Standard-) avec les souches bactériennes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* 13, et avec la levure *Candida albicans* UMIP 88465 ; et par la technique d'ensemencement par touche sur le milieu de culture Sabouraud avec les souches deux fongiques *Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74 et *Trichophytum rubrum* CIP 2043.92. Les boîtes de Pétri sont laissées 2 heures à $+4C^{\circ}$ pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives (Tortorano *et al.*, 1979). La lecture des résultats est réalisée après 24 heures. Les résultats positifs se traduisent par l'apparition de zones d'inhibition de croissance autour des disques.

2-3-Analyses statistiques

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test *t* de Student. Les résultats (exprimés par moyenne + SD) sont analysés par différents logiciels de traitements statistiques : l'Excel et SPSS.

Le coefficient de corrélation de Pearson au seuil $\alpha = 5\%$ est utilisé pour évaluer la corrélation entre les différents paramètres étudiés (logiciel SPSS version 9,0).

Résultats et discussion

1-L'évolution du poids des animaux et la quantité de l'aliment consommé pendant toute la durée de l'expérimentation

L'évolution du poids des rats de chaque lot et celle de la quantité de l'aliment consommé ont été enregistrées pendant toute la durée de l'expérimentation. Les résultats sont résumés dans le tableau 2.

D'une manière générale, nous remarquons une augmentation du poids des animaux pour les trois lots C, M et MHE de la première semaine jusqu'à la dernière semaine S6 (fig. 9).

le test *t*-Student a révélé une différence très hautement significative ($p \leq 0.0001$).

Contrairement à l'évolution du poids des animaux, la prise alimentaire était irrégulière où nous enregistrons des variations plus marquées (Fig.10).

L'évolution du poids des rats des trois lots durant l'expérimentation a révélé un important gain de poids chez les rats contrôles depuis la 2^{ème} semaine (199,97 gr \pm 13,09), jusqu'à la dernière S6 (270,88 gr \pm 2,73). Ces résultats sont très hautement significatifs selon le test de Student.

La même évolution du poids a été remarquée chez les rats traités par la méthionine « M » ; cette fois-ci le gain du poids s'arrête au niveau de la 5^{ème} semaine (271,07 gr \pm 9,21) pour avoir ensuite une perte de poids dans S6 (263,64 gr \pm 7,41) ; résultats très hautement significatifs.

Pour le lot « MHE », nous remarquons la même évolution du poids que le lot contrôle, c'est-à-dire un gain du poids depuis la deuxième semaine (266,39 gr \pm 7,03) jusqu'à la dernière (299,40 gr \pm 9,06) (Tab.2, Fig.9).

Les résultats du taux de l'alimentation des rats des trois lots montrent une consommation très importante de l'aliment chez les rats du lot « C » durant les trois premières semaines (200,00 gr \pm 0,00 pour S3). Au cours de la 4^{ème} et la 5^{ème} semaines, le taux de l'alimentation diminue de façon très hautement significative (120,91 gr \pm 0,00 pour S5); la 6^{ème} semaine montre une augmentation légère de la quantité de l'aliment consommé (135,97 gr \pm 0,00).

Pour le lot « M » nous avons enregistré une augmentation importante de la quantité de l'aliment consommé dans les quatre premières semaines (153,057 gr \pm 3,02 pour S4). Ce taux diminue de façon très hautement significative au cours de S5 (148,17 gr \pm 940) pour reprendre finalement son augmentation dans la dernière semaine S6 (176,76 gr \pm 38,76).

Contrairement aux deux premiers lots, le lot « MHE » montre une diminution très hautement

significative de la quantité de l'aliment consommé depuis la 2^{ème} semaine (146,98 gr \pm 11,21) jusqu'à la 4^{ème} (139,81 gr \pm 6,60) ; durant la 5^{ème} semaine, il marque une augmentation très hautement significative (149,755 gr \pm 3,35) pour reprendre sa diminution au cours de S6 (145,95 gr \pm 15,165) (Tab.2, Fig.10).

Une corrélation entre le poids des animaux et la quantité de l'aliment consommé a été calculée :

Pour le lot C, cette corrélation est positive non significative pour S5 ($r = 0.080$, $p = 0.865$), négative non significative pour S4 et S6 ($r = -0.232$, $p = 0.617$) et ($r = -0.663$, $p = 0.105$) et non connue pour les trois premières semaines.

Pour le lot M, il existe une corrélation négative significative durant la période S1, S4 et S6 ($r = -0.820$ à $p = 0.024$, $r = -0.853$ à $p = 0.015$ et $r = -0.999$ à $p = 0.023$) et positive non significative durant S2, S3 et S5 ($r = 0.639$ à $p = 0.122$, $r = 0.341$ à $p = 0.455$, $r = 0.604$ à $p = 0.151$).

Concernant le lot MHE, il existe une corrélation positive non significative durant S2 et S5 ($r = 0.414$ à $p = 0.356$, $r = 0.227$ à $p = 0.624$) et négative non significative pour les autres semaines.

**Tableau 2: Récapitulatif des résultats du poids de l'animal et de l'aliment consommé
durant toute la période de l'expérimentation**

	Lot C	Lot C	Lot M	Lot M	Lot MHE	Lot MHE
	Poids de l'animal (gr)	Poids de l'aliment consommé (gr)	Poids de l'animal (gr)	Poids de l'aliment consommé (gr)	Poids de l'animal (gr)	Poids de l'aliment consommé (gr)
S1	196,77 ± 11,23	100,00 ± 0,00	221,57 ± 3,91	126,45 ± 21,60	256,37 ± 9,39	178,071 ± 13,44
S2	199,97 ± 13,09	200,00 ± 0,00	224,55 ± 7,44	140,81 ± 9,54	266,39 ± 7,03	146,98 ± 11,21
S3	224,03 ± 5,98	200,00 ± 0,00	243,99 ± 9,90	150,57 ± 5,17	272,00 ± 8,86	142,25 ± 13,30
S4	244,401 ± 3,03	172,55 ± 0,00	265,45 ± 9,88	153,057 ± 3,02	278,06 ± 13,23	139,81 ± 6,60
S5	257,88 ± 5,80	120,91 ± 0,00	271,07 ± 9,21	148,17 ± 9,40	291,27 ± 8,19	149,557 ± 3,35
S6	270,11 ± 2,73	135,97 ± 0,00	263,64 ± 7,41	176,76 ± 38,76	299,40 ± 9,06	145,95 ± 15,165

S1, S2, S3, S4, S5, S6 : les six semaines de l'expérimentation

Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.D.

p>0.05 : la différence n'est pas significative ; 0.05>p>0.01 : la différence est significative ; 0.05>p>0.001 : la différence est hautement significative** ; p<0.001 : la différence est très hautement significative***.*

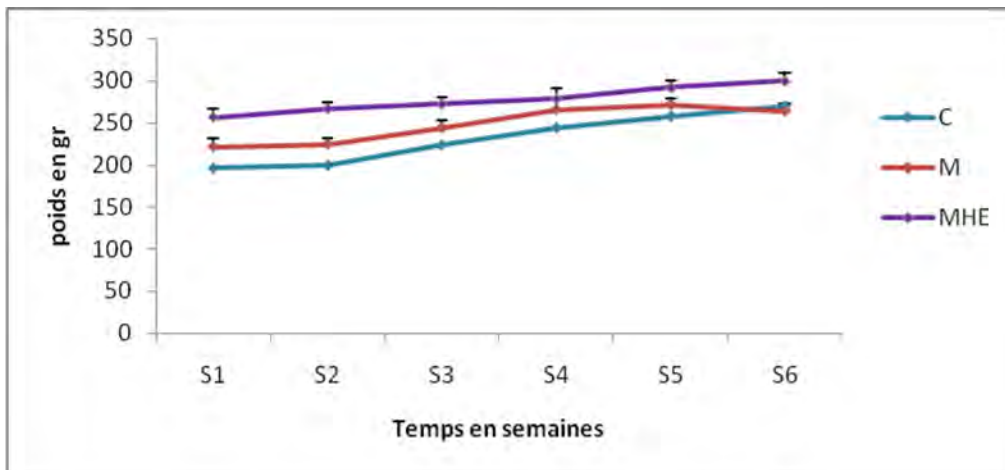


Figure 9 : Évolution du poids des rats pendant toute la durée de l'expérimentation

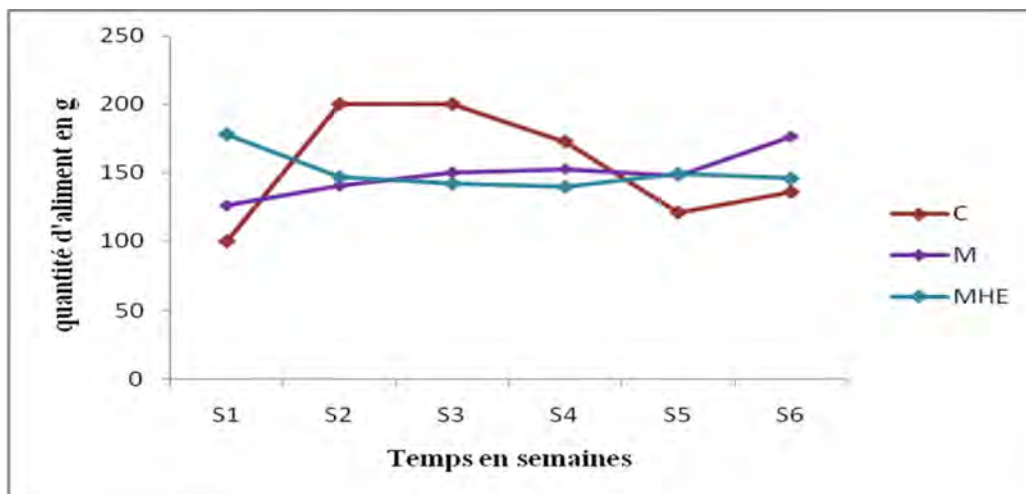


Figure 10 : Évolution de la quantité de l'aliment consommé par les rats durant toute la période de l'expérimentation

2-Activité antioxydante de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa*

2-1-Expérience I (Action de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat)

Les taux du MDA et des protéines totales plasmatiques et tissulaires de l'expérience I sont présentés dans le tableau 3.

1- MDA plasmatique et hépatique

Pour le MDA plasmatique, les résultats indiquent une diminution très hautement significative ($p \leq 0,0001$) de sa concentration chez le lot traité M ($53,948 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 14,839$) par rapport au lot contrôle ($60,538 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 4,75$) (Tab.3, Fig.11).

Contrairement au MDA plasmatique, une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration du MDA hépatique a été remarquée chez le lot M ($15,91 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 6,10$) par rapport au lot contrôle ($11,01 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 5,50$) (Tab.3, Fig.12).

Il existe une corrélation négative non significative entre le MDA plasmatique et le MDA hépatique pour le lot « C » ($r = -0.781$ à $p = 0.119$) et positive non significative ($r = +0.678$ à $p = 0.139$) pour le lot « M ».

2- Protéines totales plasmatiques et hépatiques

Les résultats expérimentaux indiquent une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.0001$) du taux des protéines totales plasmatiques chez le lot M ($16,777 \mu\text{M}/\text{ml}$ $\pm 1,71$) par rapport au lot contrôle ($15,31 \mu\text{M}/\text{ml}$ $\pm 2,07$) (Tab.3, Fig.13).

Par opposition, nous remarquons une diminution significative ($p \leq 0.013$) des protéines totales tissulaires chez le lot traité M ($19,18 \mu\text{M}/\text{g}$ de tissu $\pm 10,10$) par rapport au lot C ($19,46 \mu\text{M}/\text{g}$ de tissu $\pm 8,66$) (Tab.3, Fig.14).

Il existe une corrélation négative non significative entre les protéines totales plasmatiques et les protéines totales hépatiques pour le lot « C » ($r = -0.534$ à $p = 0.354$) et positive non significative ($r = +0.748$ à $p = 0.146$) pour le lot « M ».

Tableau 3 : Taux du MDA et des protéines totales de l'expérience I

	Lot C	Lot M
MDA plasmatique ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines/ml)	60,538 \pm 4,75	53,948 \pm 14,839 ^{***}
MDA hépatique ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines/g de tissu)	11,01 \pm 5,50	15,91 \pm 6,10 ^{**}
Protéines totales plasmatiques (mg/ml)	15,31 \pm 2,07	16,777 \pm 1,71 ^{***}
Protéines totales hépatiques (mg/g de tissu)	19,46 \pm 8,66	19,18 \pm 10,10 [*]

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD.

$p > 0.05$: la différence n'est pas significative ; $0.05 > p > 0.01$: la différence est significative* ; $0.05 > p > 0.001$: la différence est hautement significative** ; $p < 0.001$: la différence est très hautement significative***.

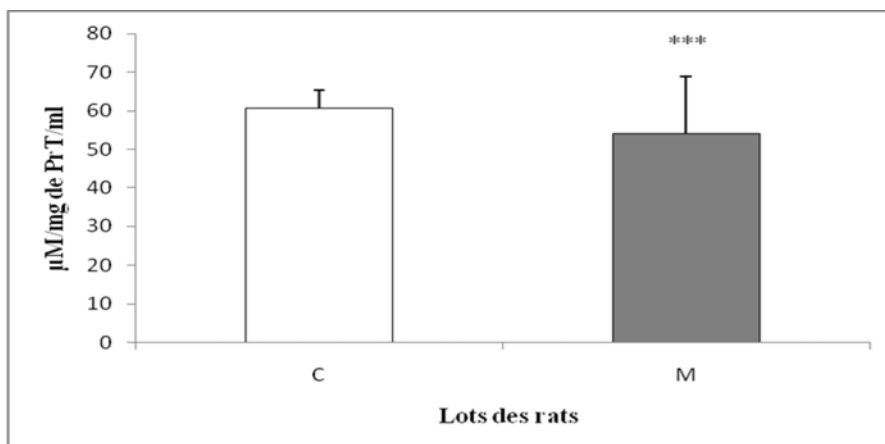


Figure 11 : Taux du MDA plasmatique chez les rats lors de l'expérience I

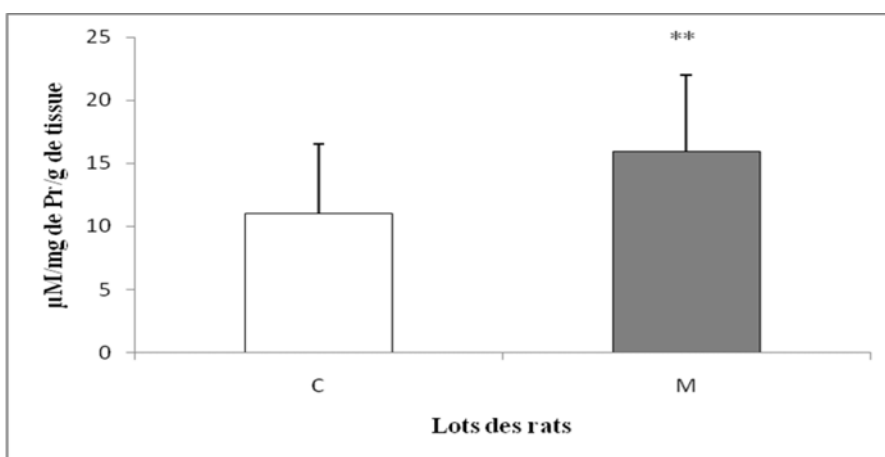


Figure 12 : Taux du MDA hépatique chez les rats lors de l'expérience I

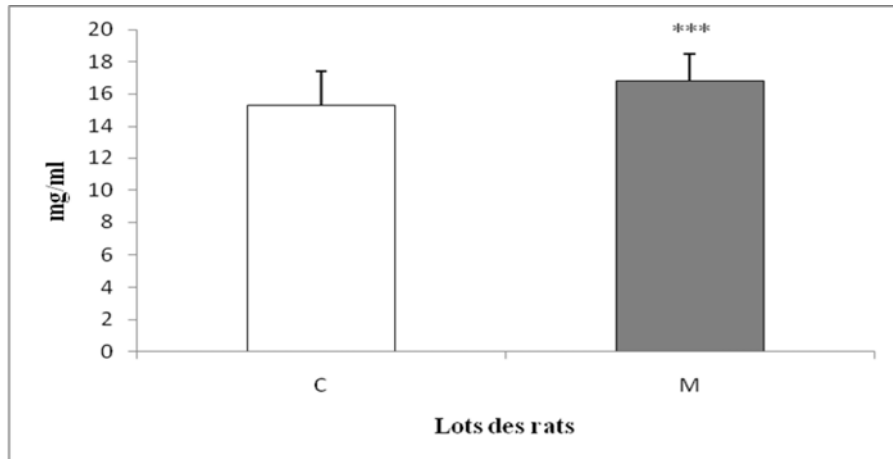


Figure 13 : Taux des protéines totales plasmatiques chez les rats lors de l'expérience I

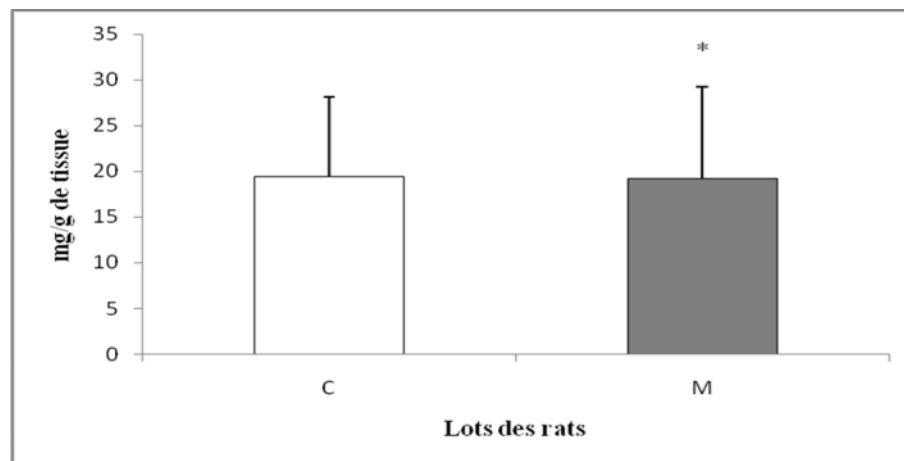


Figure 14 : Taux des protéines totales hépatiques chez les rats lors de l'expérience I

2-2-Expérience II (effet de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* associé au traitement de dose élevée de la L-Méthionine chez le rat)

Les taux du MDA et des protéines totales plasmatiques et tissulaires de l'expérience II sont présentés dans le tableau 4.

1-MDA plasmatique et tissulaire

En comparant les trois lots ensemble, nous remarquons une diminution très hautement significative du taux du MDA plasmatique chez les lots traités M ($53,948 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 14,839$; $p \leq 0,0001$) et MHE ($46,929 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 4,51$; $p \leq 0,0001$) par rapport au lot contrôle ($60,538 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 4,75$) (Tab.4, Fig.15).

En revanche, les taux tissulaires du MDA chez les lots traités « M » ($15,91 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 6,10$; $p \leq 0,001$) et « MHE » ($13,62 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 6,11$, $p \leq 0,008$) sont largement supérieures à celui du lot « C » ($11,01 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 5,50$) (Tab.4, Fig.16).

En confrontant les deux lots traités (M et MHE), nous remarquons une diminution très hautement significative ($p \leq 0,0001$) du taux du MDA plasmatique chez le lot MHE ($46,929 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 4,51$) par rapport au lot M ($53,948 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 14,839$). La même évolution a été remarquée pour le MDA hépatique. En effet, les résultats indiquent une diminution significative ($p \leq 0,008$) de son taux chez le lot MHE ($13,62 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 6,11$) par rapport au lot M ($15,91 \mu\text{M}/\text{mg}$ de Pr/ml $\pm 6,10$).

Il existe une corrélation positive significative entre le MDA plasmatique et le MDA hépatique chez le lot « MHE » ($r = 0.918$ à $p = 0.028$) et positive non significative chez le lot « M » ($r = 0.678$ à $p = 0.139$) et négative non significative ($r = -0.781$ à $p = 0.119$) chez le lot « C ».

2-Protéines totales plasmatiques et hépatiques

-Pour les protéines totales plasmatiques :

1- En comparant les trois lots ensemble, nous observons une augmentation négligeable du taux des protéines totales chez les lots traités M ($16,777 \mu\text{M}/\text{ml}$ $\pm 1,71$; $p \leq 0,0001$) et MHE ($15,956 \mu\text{M}/\text{ml}$ $\pm 1,32$; $p \leq 0,0001$) par rapport au lot contrôle ($15,31 \mu\text{M}/\text{ml}$ $\pm 2,07$) (Tab.4, Fig.17).

2-En confrontant les deux lots traités, nous remarquons une diminution très hautement significative ($p \leq 0,0001$) du taux des protéines totales chez le lot MHE ($15,956 \mu\text{M}/\text{ml}$ $\pm 1,32$) par rapport au lot M ($16,777 \mu\text{M}/\text{ml}$ $\pm 1,71$).

-Pour les protéines totales hépatiques, les résultats expérimentaux montrent une légère

augmentation -hautement significative- ($p \leq 0,001$) de leur taux chez le lot MHE (21,295 $\mu\text{M/g}$ de tissu $\pm 7,26$) par rapport aux lots M (19,18 $\mu\text{M/g}$ de tissu $\pm 10,10$) et C (19,465 $\mu\text{M/g}$ de tissu $\pm 8,66$) (Tab.4, Fig.18).

Il existe une corrélation négative non significative entre les protéines totales plasmatiques et les protéines totales hépatiques chez les lots «C » ($r = -0.534$ à $p = 0.354$) et MHE ($r = -0.547$ à $p = 0.262$) et positive non significative chez le lot «M » ($r = 0.748$ à $p = 0.146$).

Tableau 4 : Taux du MDA et des protéines totales de l'expérience II

	Lot C	Lot M	Lot MHE
MDA plasmatique ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines/ml)	60,538 \pm 4,75	53,948 \pm 14,839 ^{***}	46,929 \pm 4,51 ^{***§§§}
MDA hépatique ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines/g de tissu)	11,01 \pm 5,50	15,91 \pm 6,10 ^{**}	13,62 \pm 6,11 ^{*§}
Protéines totales plasmatiques (mg/ml)	15,31 \pm 2,07	16,777 \pm 1,71 ^{***}	15,95 \pm 1,32 ^{***§§§}
Protéines totales hépatiques (mg/g de tissu)	19,46 \pm 8,66	19,18 \pm 10,10 [*]	21,29 \pm 7,26 ^{**§§}

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD.

$p > 0.05$: la différence n'est pas significative ; $0.05 > p > 0.01$: la différence est significative* ; $0.05 > p > 0.001$: la différence est hautement significative** ; $p < 0.001$: la différence est très hautement significative***.

§ : Signifie que le lot MHE est comparé au lot M

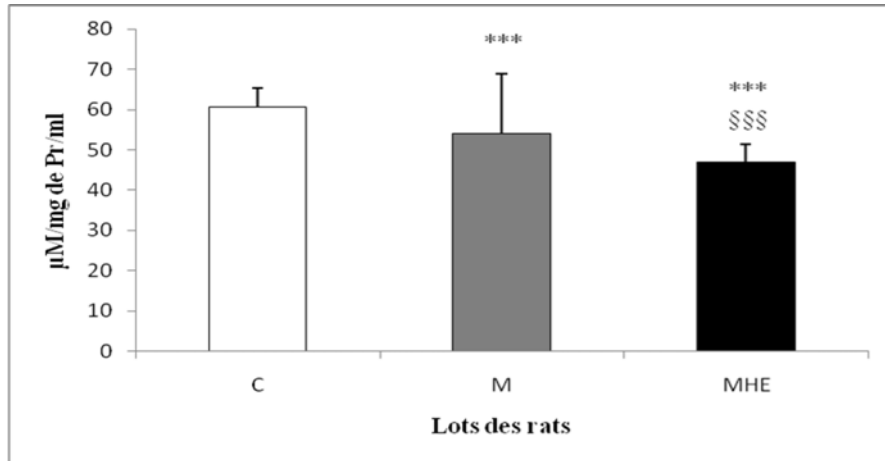


Figure 15 : Taux du MDA plasmatique chez les rats lors de l'expérience II

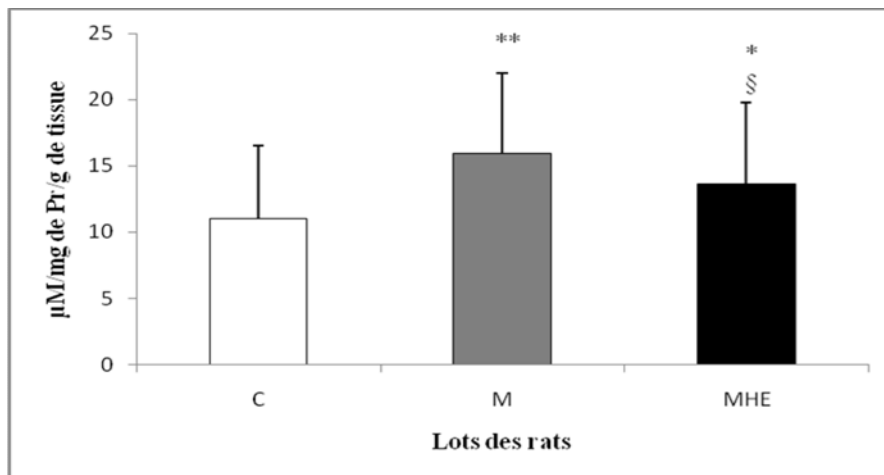


Figure 16 : Taux du MDA hépatique chez les rats lors de l'expérience II

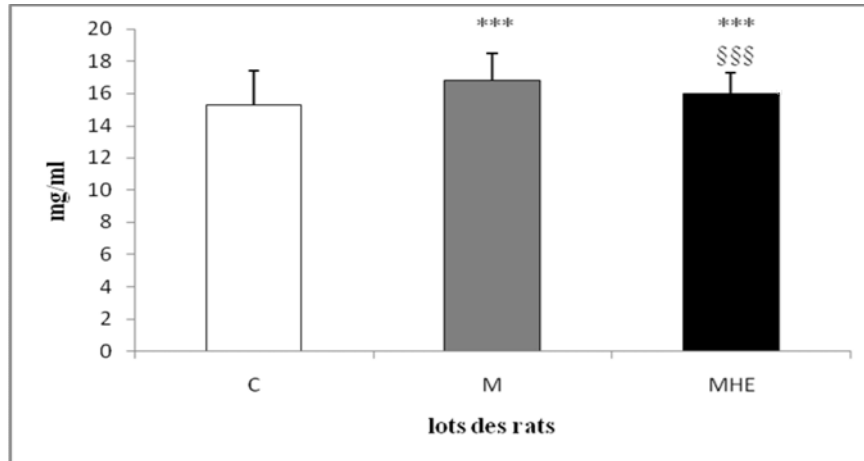


Figure 17 : Taux des protéines totales plasmatiques chez les rats lors de l'expérience II

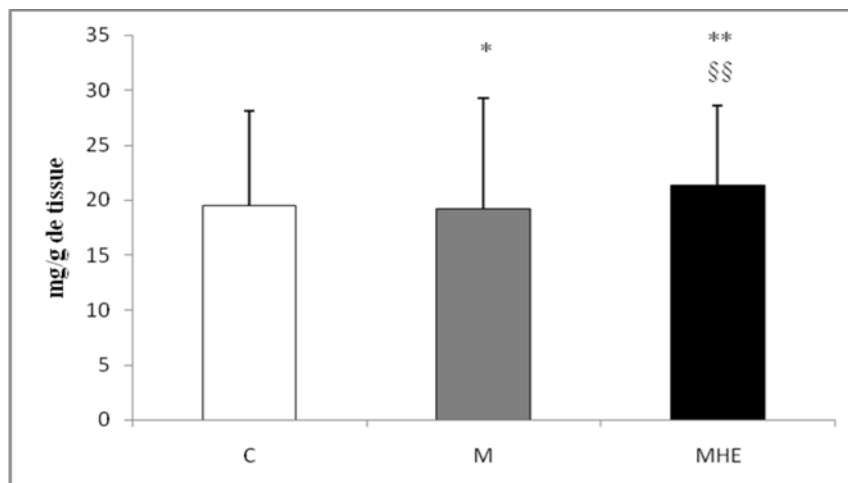


Figure 18: Taux des protéines totales hépatique chez les rats lors de l'expérience II

Discussion

Dans le but d'étudier l'effet oxydant de dose élevée de méthionine, et pour évaluer l'effet antioxydant de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* chez le rat, deux paramètres biochimiques ont été étudiés : le MDA (malondialdéhyde) et les protéines cellulaires totales.

Les dosages plasmatiques et tissulaires de ces deux paramètres ont révélé des taux très variables selon les différents cas.

Suite au traitement des rats par une dose élevée de la L-Méthionine, nous avons remarqué une diminution des taux du MDA plasmatique et des protéines totales hépatiques ; et en revanche, une augmentation des taux du MDA hépatique et des protéines totales plasmatiques.

La diminution du taux du MDA plasmatique chez ces rats (lot M) peut être expliquée par l'étude de **Caylak *et al* ;(2008)**, réalisée sur des rats Wistar traités par une concentration de 100 mg/kg/jour de méthionine + 2000 ppm de l'acétate pendant cinq semaines. Cette étude indique que la méthionine joue un rôle important comme un antioxydant puisqu'il est le précurseur du glutathion (GSH). Ce pouvoir antioxydant est dû à son groupement thiol (SH) qui possède le pouvoir de scavenger des radicaux libres générés indirectement par l'hyperhomocystéinémie.

L'augmentation du taux du MDA hépatique chez le lot M indique que la méthionine est engagée dans son cycle métabolique dont l'élévation produit une hyperhomocystéinémie. Au niveau cellulaire, cette hyperhomocystéinémie se traduit par le phénomène de la peroxydation lipidique.

Des résultats identiques ont été rapportés par **Woo *et al* ;(2006)**, **Yalçinkaya *et al* ;(2007)** et **Yalçinkaya *et al* ;(2009)**.

L'augmentation du taux des protéines totales plasmatiques chez le lot M par rapport au lot contrôle révèle une augmentation du taux des protéines oxydées ; cela nous permet de conclure qu'il y a une attaque des protéines plasmatiques par les radicaux libres produits indirectement par l'hyperhomocystéinémie.

La diminution du taux des protéines totales hépatique suggère qu'il y a une dégradation cellulaire des protéines oxydées. Plusieurs études ont montré qu'il existe une relation étroite entre la concentration des protéines oxydées et l'activation du système ubiquitine-protéasome (**Koechlin-Ramontxo, 2006**).

Les travaux de **Perez *et al* ;(2007)** montrent que l'hyperhomocystéinémie augmente la dégradation des protéines cellulaires endommagées de haut et de moyen poids moléculaires.

Il a été rapporté que l'homocystéine influence le cycle des protéines via son interaction avec les systèmes de protéolyse cellulaire, surtout dans les organes métaboliquement actifs comme le foie dont la concentration en homocystéine est largement supérieure à celle du plasma (**Stern et al ; 2004**).

Le traitement des rats hyperhomocystéinémiques par l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* a induit des changements au niveau des taux du MDA et des protéines totales par rapport à ceux des rats recevant une dose élevée de la L-Méthionine. Ainsi, nous avons enregistré une diminution des taux du MDA plasmatique et hépatique, et des protéines totales plasmatiques ; et en revanche, une augmentation du taux des protéines totales hépatiques.

La diminution des taux du MDA (plasmatique et hépatique) et des protéines totales plasmatiques permet de conclure que l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* a un pouvoir antioxydant.

Il a été rapporté que les escargots du genre *Helix* sont très riches en sélénium qui a un pouvoir antioxydant considérable (**Toader-Williams et Golubkina, 2009**).

Des travaux ultérieurs réalisés par **Ferreira et al ; (2003)**, **Ramos-Vasconcelos et Hermes-Lima, (2003)** et **Ramos-Vasconcelos et al ;(2005)** ont montré qu'il y a une augmentation de certains antioxydants comme le glutathion (GSH), et de certaines enzymes antioxydantes, plus précisément la GPx-sélénium dépendante (Se-GPx) chez l'escargot *Helix aspersa* pendant l'estivation (au niveau du muscle -la chair- et l'hépatopancréas). Ces études montrent que la saisonnalité module non seulement le taux et l'activité des antioxydants chez *Helix aspersa*, mais aussi les processus régulateurs qui contrôlent la capacité antioxydante de ces escargots durant l'estivation. C'est une stratégie adaptative pour minimiser les effets des radicaux libres pendant l'altération du métabolisme cellulaire. On suggère que *Helix aspersa* a une « montre intérieure » pour contrôler le métabolisme des radicaux libres dans les différentes saisons.

L'augmentation du taux des protéines totales hépatiques suite au traitement des rats hyperhomocystéinémiques par l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* peut être expliquée par les études de **Gomot, (1998)** qui ont été réalisées sur la composition biochimique de l'escargot *Helix aspersa*. Ces études montrent que la chair de cet escargot est très riche en protéines et en eau, et très pauvre en graisses. Le taux élevé des protéines implique un taux élevé en méthionine, cette dernière va s'engager dans son cycle métabolique pour donner finalement une hyperhomocystéinémie. Cela nous permet de conclure que l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* augmente le risque de l'hyperhomocystéinémie.

3-Activité antimicrobienne de l'escargot *Helix aspersa*

L'activité antibactérienne, antifongique et anticandidale des extraits des gastéropodes a été mise en évidence par la technique des disques en papier qui est une technique de diffusion en milieu gélosé.

Après incubation, la présence d'activité antimicrobienne est visualisée par une zone transparente au niveau de la zone de diffusion de l'antibiotique. En l'absence de molécules bioactives, le développement des microorganismes est visible comme le montre les photographies 1, 2, 3 et 4

Toutes les photographies ont été prises par un appareil photo numérique « FUGIFILM » de résolution de 10,2 Méga pixel (Zoom optique ×1).

Une batterie de solvants organiques de polarité différente (l'hexane, le méthanol et l'eau distillée) à été utilisée pour l'extraction des molécules bioactives à partir de l'homogénat des gastéropodes.

Les résultats des activités antimicrobiennes sont résumés dans les tableaux 5 et 6.

3-1-Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa*

Sur les trois extraits exploités, l'extrait préparé à partir de l'eau distillée est le seul qui a présenté une activité antibactérienne et envers les trois bactéries tests à la fois.

Aucune activité antifongique et anticandidale n'a été détectée à partir des extraits méthanoliques, hémoxaniques et les extraits préparés à partir de l'eau distillée.

Les plus grands diamètres des zones d'inhibition ont été obtenus par les disques imprégnés des extraits préparés à partir de l'eau distillée envers *Escherichia coli* ATCC 25922 (9,66 mm en moyenne), suivis par ceux obtenus par les disques préparés vis-à vis de *Pseudomonas aeruginosa* 13 (9,33 mm en moyenne), et les plus faibles diamètres des zones d'inhibition sont ceux obtenus par les disques préparés envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (8,66 mm en moyenne).

Notons que les disques témoins, ne renfermant que les solvants purs, n'ont présenté aucune activité anticellulaire, ce qui confirme l'affiliation des activités décelées aux molécules bioactives de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa*.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Iguchi et al;(1982)** en utilisant l'escargot géant d'Afrique : *Achatina fulica* Férussac. Cette étude montre (en utilisant la méthode des

disques en papier) que le mucus de cet escargot possède des propriétés antibactériennes vis-à-vis à la fois des bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et à coloration de Gram positive (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*).

Tous ces résultats font ressortir l'eau distillée comme le meilleur solvant pour l'extraction des molécules antibactériennes de l'homogénat des escargots.

D'après les diamètres des zones d'inhibition d'inhibition, *Escherichia coli* ATCC 25922 semble être la plus sensible des trois bactéries tests.

Tableau 5: Activité antimicrobienne en (mm) des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers les bactéries-tests

Bactéries tests		Extraits méthanoliques	Extraits hémoxanoiques	Extraits préparés à partir de l'eau distillée
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	R1	-	-	10
	R2	-	-	10
	R3	-	-	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	R1	-	-	8
	R2	-	-	9
	R3	-	-	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13	R1	-	-	10
	R2	-	-	9
	R3	-	-	9

R1 / R2 / R3 : Répétitions

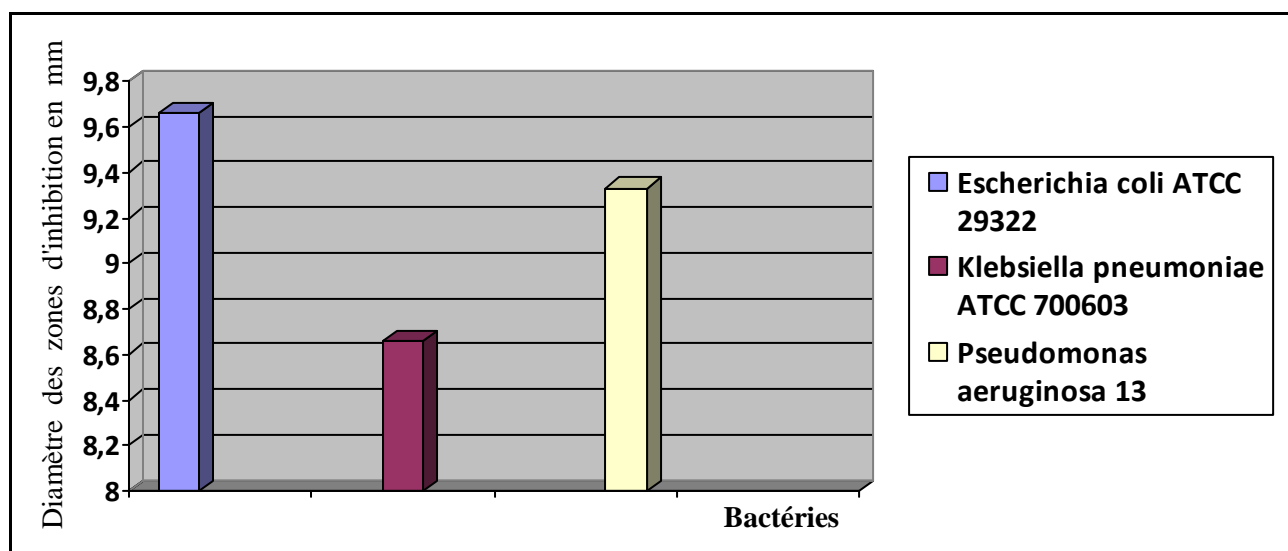
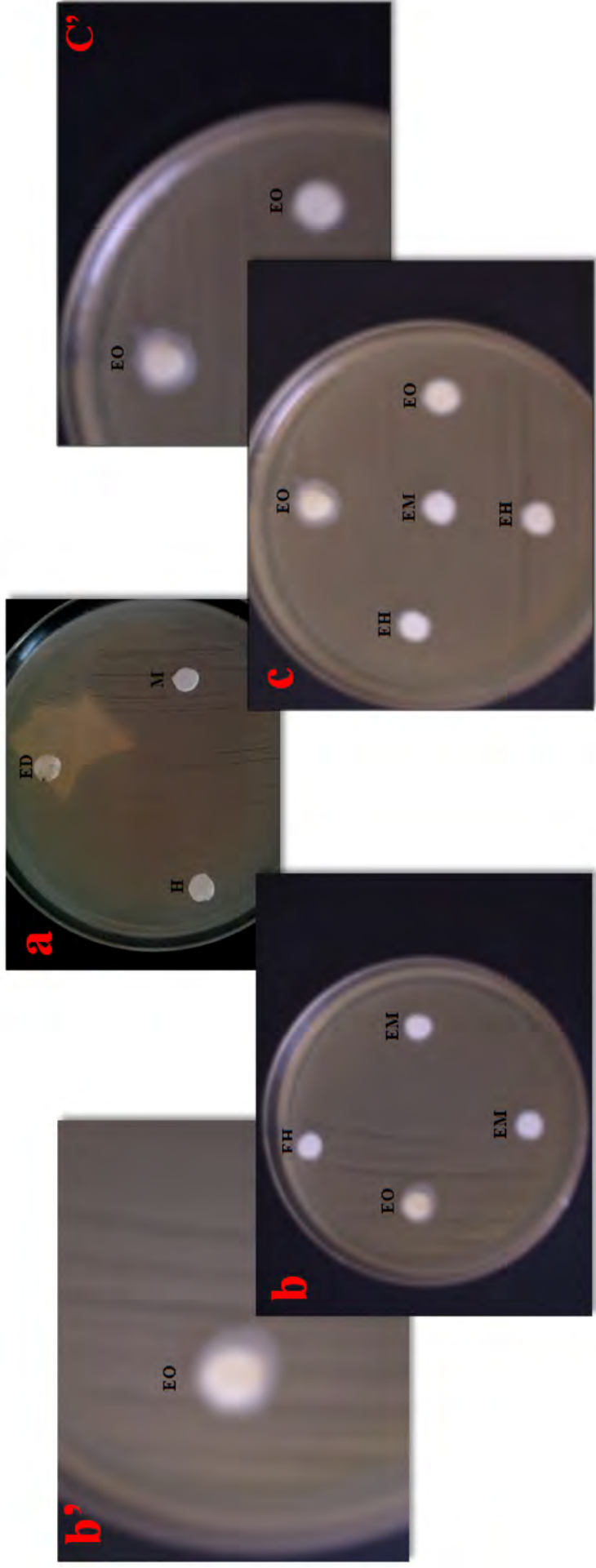


Figure 19 : Activité antibactérienne des extraits organiques de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* préparés à partir de l'eau distillée

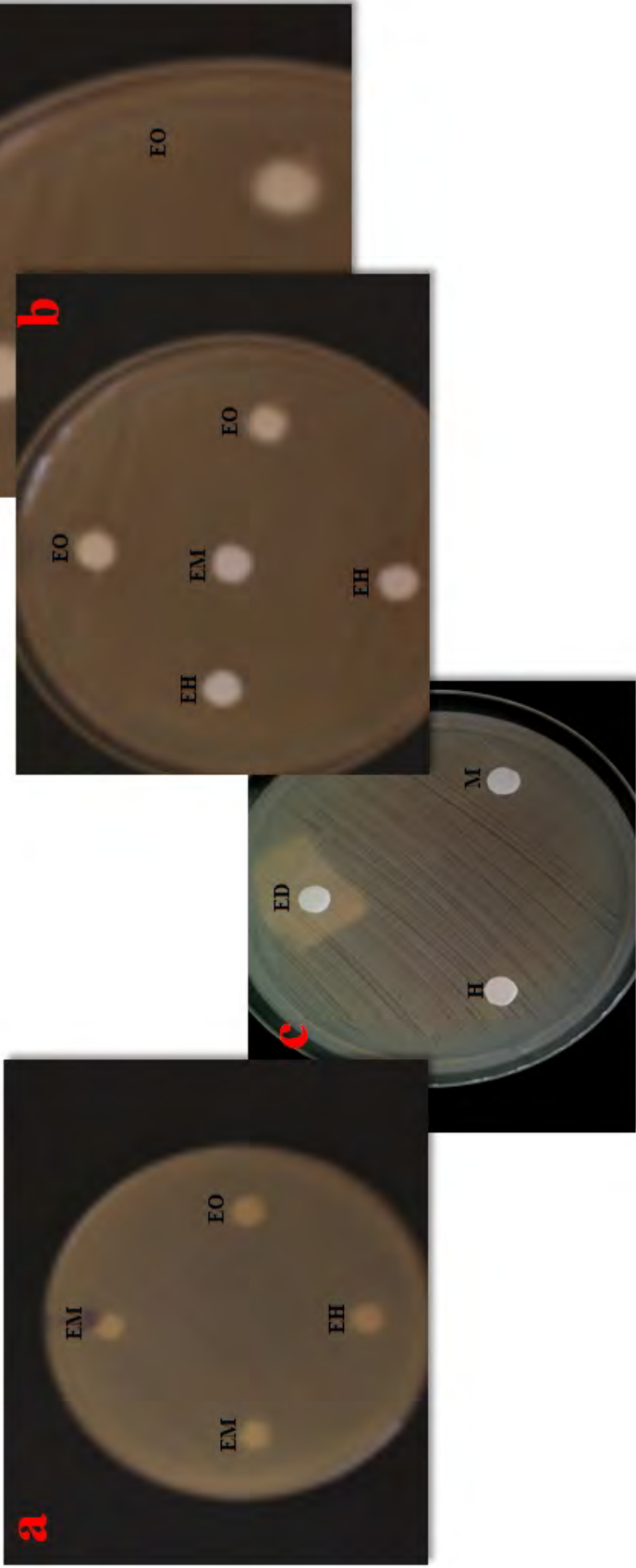
Tableau 6 : Activité antimicrobienne en (mm) des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers les champignons filamenteux tests et la levure *Candida albicans* UMIP 88465

Champignons tests		Extraits méthanoliques	Extraits héxanoïques	Extraits préparés à partir de l'eau distillée
<i>Aspergillus fumigatus</i> CIP 1082.74	R1	-	-	-
	R2	-	-	-
	R3	-	-	-
<i>Trichophytum rubrum</i> CIP 2043.92	R1	-	-	-
	R2	-	-	-
	R3	-	-	-
<i>Candida albicans</i> UMIP 88465	R1	-	-	-
	R2	-	-	-
	R3	-	-	-

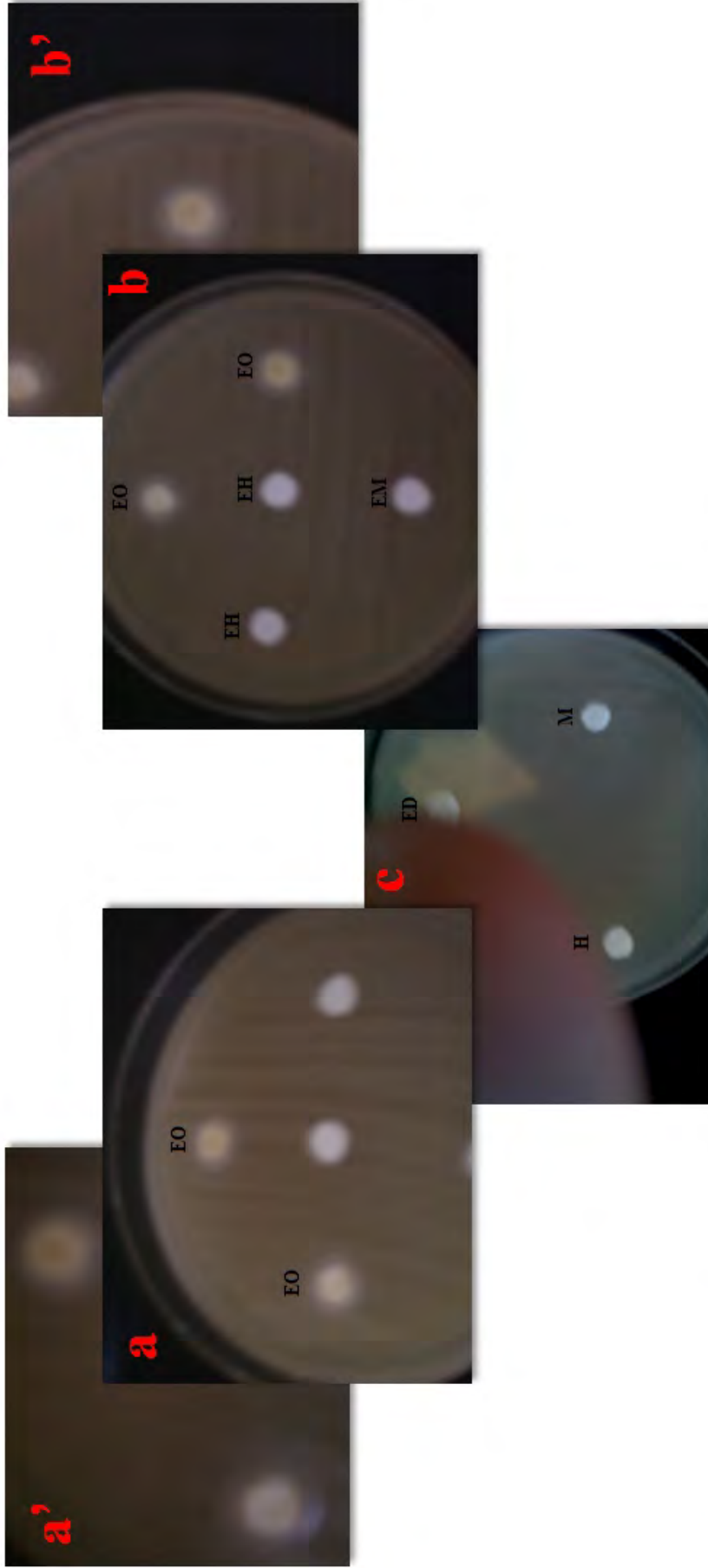
R1 / R2 / R3 : Répétitions



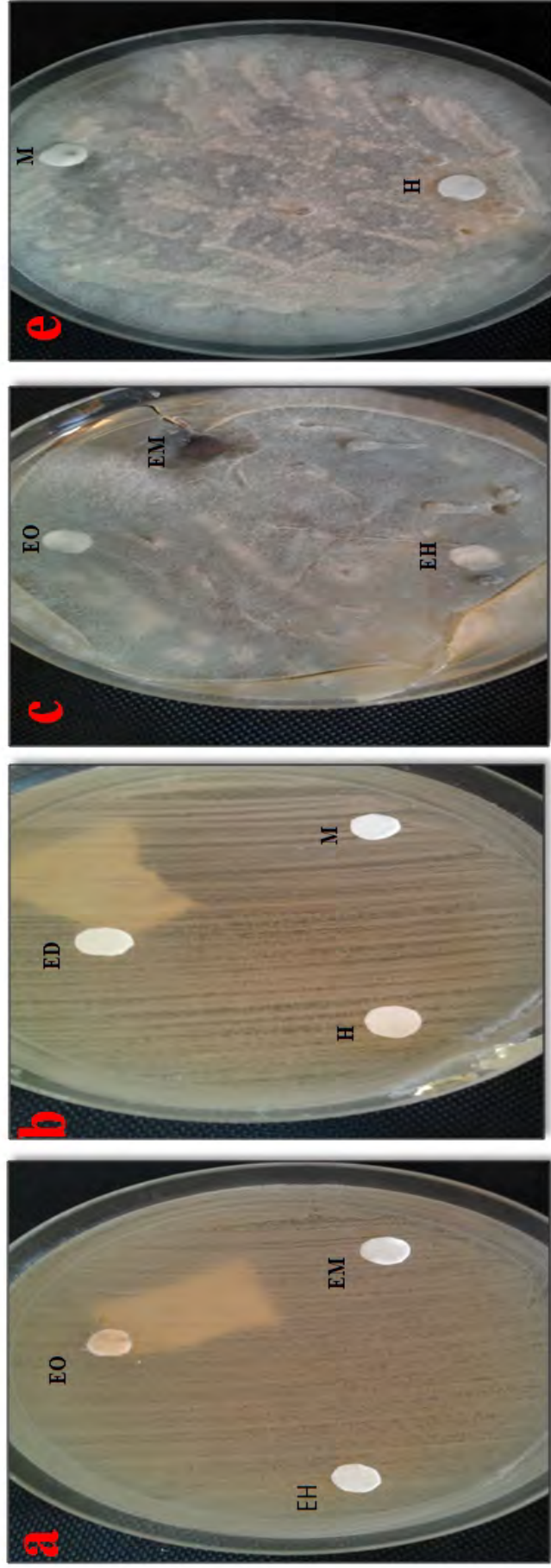
Photographie 1 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *Escherichia coli* ATCC 25922. **EO** : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, **EM** : Extraits méthanoliques, **EH** : Extraits hexanoïques, **ED** : Eau distillée, **M** : Méthanol, **H** : Hexane. La photo **c**'est prise au grossissement ($\times 1$), et la photo **b'** est prise au grossissement ($\times 2$).



Photographie 2 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. **EO** : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, **EM** : Extraits méthanoliques, **EH** : Extraits hexanoïques, **ED** : Eau distillée, **M** : Méthanol, **H** : Hexane. La photo b' est prise au grossissement ($\times 1$).



Photographie 3 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *Pseudomonas aeruginosa* 13. **EO** : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, **EM** : Extraits méthanoliques, **EH** : Extraits hexanoïques, **ED** : Eau distillée, **M** : Méthanol, **H** : Hexane. Les photos a' et b' sont prises au grossissement (×1).



Photographie 4 : Activité antimicrobienne des extraits organiques bruts de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* envers *a* et *b* *Candida albicans* UMIP 88465, c et d envers *Trichophyllum rubrum* CIP 204392. EO : Extraits préparés à partir de l'eau distillée, EM : Extraits méthanoliques, EH : Extraits hexanoïques, ED : Eau distillée, M : Méthanol, H : Hexane. Les photos a' et b' sont prises au grossissement (×1).

3-2-Caractérisation préliminaire des molécules bioactives contenues dans l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa*

D'après les résultats des tableaux 5 et 6, la caractérisation préliminaire des molécules bioactives de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* peut être expliquée selon deux niveaux :

1/ Nature Chimique du solvant de l'extraction

L'hexane est un solvant apolaire, le méthanol est un solvant polaire, et l'eau distillée est un solvant très polaire (le plus polaire de tous les solvants organiques). La polarité de chaque solvant est mesurée par le paramètre physique : la constante diélectrique.

Puisque les extraits bruts de l'homogénat des escargots préparés à partir de l'eau distillée sont les seuls qui ont montré une activité antibactérienne envers les trois bactéries tests, et sur la base des données chimiques précédemment citées, on peut conclure que les extraits bruts de l'homogénat des escargots renferment des molécules bioactives à activité antibactérienne de nature chimique hautement polaire.

L'absence des activités antifongiques et antilevuriennes dans les trois types d'extraits bruts de l'homogénat des gastéropodes peut être expliquée par l'absence de molécules bioactives envers les deux champignons filamenteux tests et la levure *Candida albicans* UMIP 88465.

2/ Composition biochimique de la chair de l'escargot *Helix aspersa*

La nature biochimique des molécules bioactives de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* peut être expliquée par les études de **Gomot, (1998)** qui ont été réalisées sur la composition biochimique d'*Helix aspersa*. Ces études montrent que la chair de cet escargot est très riche en protéines et en eau, et très pauvre en graisses. De plus, certains minéraux et oligoéléments y sont présents en quantités très intéressantes. Il s'agit notamment du calcium, du magnésium, du phosphore, du fer, du cuivre et des vitamines (B6, B12 et C).

Une étude *in vivo* réalisée par **Otsuka-Fuchino et al; (1992)** a rapporté que l'achacine, qui est une glycoprotéine purifiée à partir du mucus de l'escargot géant d'Afrique, a un effet bactéricide en attaquant la membrane cellulaire bactérienne.

D'après la nature chimique des solvants et la composition biochimique de la chair réalisée par **Gomot, (1998)**, on peut conclure que les molécules antibactériennes des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa* sont des molécules d'un caractère chimique polaire, possédant un moment dipolaire très élevé, et peuvent être probablement de nature protéique libre et/ou liée.

Conclusion et perspectives

Les travaux menés par notre étude ont permis d'évaluer les activités antioxydante et antimicrobienne de l'escargot *Helix aspersa*.

Ce présent travail a été réalisé selon les axes de recherche suivants :

- * Étude de l'état physiologique des rats par le suivi de l'évolution du poids des animaux et la quantité de l'aliment consommé pendant toute la durée de l'expérimentation.
- * Étude des effets cellulaires d'hyperhomocystéinémie modérée chez le rat par dosage du MDA et des protéines totales plasmatiques et tissulaires.
- * Évaluation de l'activité antioxydante de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* chez le rat par dosage du MDA et des protéines totales (étude comparative).
- * Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa*.
- * Étude statistique des paramètres physiologiques et biochimiques en utilisant le logiciel *SPSS*, par l'application du test *t* de Student.

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que :

Pour l'étude physiologique, une augmentation du poids des rats a été enregistrée pour les trois lots C, M et MHE de la première semaine jusqu'à la dernière semaine S6.

Contrairement à l'évolution du poids des rats, la prise alimentaire était irrégulière où nous avons enregistré des variations plus marquées.

Les dosages du MDA et des protéines totales suite au traitement des rats par une dose élevée de la L-Méthionine ont révélé une diminution des taux du MDA plasmatique et des protéines totales hépatiques, et une augmentation des taux du MDA hépatique et des protéines totales plasmatiques.

L'administration de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* aux rats hyperhomocystéinémiques avait comme effet une diminution des taux du MDA plasmatique et hépatique, et des protéines totales plasmatiques, et en revanche une augmentation du taux des protéines totales hépatiques.

Ces résultats nous ont permis de conclure que l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* a un pouvoir antioxydant.

Quand aux résultats du test microbiologique, l'extrait organique brut des escargots préparé à partir de l'eau distillée s'est révélé très intéressant par son pouvoir antibactérien.

En terme de sensibilité au traitement antibactérien (les extraits organiques préparés à partir

de l'eau distillée), *Escherichia coli* ATCC 25922 s'est révélée la plus sensible des trois bactéries tests utilisées.

La caractérisation préliminaire des molécules antibactériennes des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa* nous a permis de conclure qu'elles peuvent être probablement de nature protéique libre et/ou liée.

Dans la continuité de ce travail de recherche décrit dans ce mémoire, il serait intéressant de :

- * Explorer l'effet préventif de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* contre le stress oxydant en utilisant des doses plus élevées de l'homogénat avant l'administration du traitement cytotoxique de la méthionine.

- * Explorer l'effet antibactérien des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa* sur d'autres bactéries, notamment celles qui sont pathogènes afin de confirmer l'efficacité ou non de ces extraits.

- * Améliorer les protocoles de l'extraction par l'application d'autres solvants organiques et procéder par une étude comparative afin d'identifier les meilleurs solvants d'extraction.

- * Identifier la CMI ou la concentration minimale des extraits organiques bruts capable d'inhiber la croissance bactérienne, et ce pour pouvoir évaluer le degré de l'efficacité de ces extraits.

- * Purifier et identifier la nature des molécules bioactives de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques très sensibles et reproductibles.

De plus et dans l'approche microbiologique, il paraît intéressant de se pencher sur l'essai *in vivo* des molécules bioactives de l'escargot *Helix aspersa* dans le but d'identifier les sites cellulaires cibles des bactéries.

Références bibliographiques

Abdessemed S., Hambaba L., Rodriguez-Guéant R.M., Payet C., Philippe G., Laroui S *et al.*, 2009. Contribution des facteurs génétiques et nutritionnels dans les hyperhomocystéinémies dans la population algérienne saine. *Nutrition clinique et métabolisme*. **23** : 50-54.

Ansart A., Vermon P., Daguzan J. 2001b. Photoperiod is the main cue which triggers supercooling ability in the land snail, *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Cryobiology*. **42**: 266-273.

Akchiche N. 2009. Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation cellulaire, la survie et la neuroplasticité : approches mécanistiques *in vitro* sur des lignées neuronales. Thèse de doctorat, spécialité : Biologie cellulaire-Nutrition, université Henri Poincaré, Nancy I. France. (264 pages).

Asayama K., Burr IM. 1985. Rat superoxyde dismutases. Purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration. *Journal of Chemistry*. **260** (4): 2212-2217. In Gueye P.M. 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, spécialité : Biochimie, université Louis Pasteur-Strasbourg I. Institut Gilbert Laustriat. UMR CNRS 7175-LC1-Faculté de Pharmacie. France. (244 P).

Aubard Y., Darodes M., Cantaloube V., Aubard V., Diallo D., Teissier M.P. 2000. Hyperhomocystéinémie et grossesse : une association dangereuse. *Journal of Gynecologie, Obstetrique, Biologie and Reproduction*. **29** (4): 363-372.

Barbé F., Klein M., Chango A. 1999. Hypothyroidism increases plasma homocysteine concentration. *Journal of Endocrinological Investigation*. **22** (suppl. n°2). In Buyscharet M., Hermans M.P. 2003. Comment je traite et prends en charge une hyperhomocystéinémie. *Flammarion Médecine-Sciences- Journée de diabétologie*. 230-235.

Beauchamps C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. **44** (1): 276-287.

Beaudeau J.L., Delattre J, Therond P. 2006. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*. **21** : 144–150.

Beeby A., Richmond L. 1989. The Shell as a site of head deposition in *Helix aspersa*. *Archives of Environmental. Contamination and Toxicology*. **18: 623-628.**

Benzi I.F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal Food Sciences*. **47: 233-261.** In Jalabert A., Stéghens J.P., Barbotte E., Martelli N., Pigue C., Florent M *et al.*, 2006. Evaluation des phénomènes de peroxydation lipidique dans les solutés de nutrition parentérale administrés aux enfants prématurés. *Nutrition clinique et métabolisme*. **20 : 61-67.**

Blandini F., Fancellu R., Martignoni E., Mangiagalli A., Pacchetti C., Samuele A *et al.*, 2001. Plasma homocysteine and 1-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clinical Chemistry*. **47: 1102-1104.**

Boger R.H., Bode-Boger S.M., Sydow K., Heistad D.D., Lentz S.R. 2000. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocysteinemia or hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. **20: 1557-1564.**

Bonnemain B. 2003. Hélices et médicaments : l'escargot au service de la santé depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours. *Revue d'histoire de la pharmacie*. N° 338 : **211-218.**

Bonnemain B. 2005. Helix and Drugs: Snails for Western Health Care From Antiquity to the present. *ECAM*. **2 (1): 25-28.**

Bonnet J.C., Aupinel P., Vrillon J.L. 1990. L'escargot *Helix aspersa*: biologie-élevage. Du laboratoire au terrain. Institut national de recherche agronomique, Paris. (INRA, Paris. ISBN : 2-7380-0247-1) (119 pages).

Broekmans W.M., Klopping-Ketelaars I.A., Schuurman C.R., Verhagen H., Van den Berg H., Kok F.J *et al.* 2000. Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *Journal of nutrition*. **130: 1578-1583.**

Brosman J.T., Jacobs R.L., Stead L.M., Brosman M.E. 2004. Methylation demand: a key

determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochimica Polonica*. **51: 405-413.**

Buyscharet M., Hermans M.P. 2003. Comment je traite et prends en charge une hyperhomocystéinémie. *Flammarion Médecine-Sciences- Journée de de diabétologie*.230-235.

Caylak E., Aytekin M., Halifeoglu I. 2008. antioxidant effects of methionine, α -lipoic acid, *N*-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **60 : 289-294.**

Chamberlin M.E., Ubagai T., Mudd S.H., Thomas J., Pao VY., Nguyen T.K *et al.*, 2000. Methionine adénosyl-transferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *American Journal of Human Genetics*. **66: 347-355.**

Champ A.G., Ladha S., Clark D.C., Grimble R.F., Lund E.K. 1997. The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids*. **32 (2): 179-184.**

Chen M. 2009. Influence des donneurs de méthyle et du métabolisme de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI : étude de population et modèle expérimental chez le raton carencé. Thèse de doctorat, spécialité : Biologie cellulaire-Nutrition, université Henri-Poincaré-Nancy I. France. Faculté de médecine.(157pages).

Collins A. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies. Reliability, validation and applications. *Environmental Molecular Mutagenesis*. **30: 139-146.**

Cook J.W., Taylor L.M., Orloff S.L., Landry G.J., Moneta G.L., Porter J.M. 2002. Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms. *Vascular Pharmacology*. **38: 293-300.**

Corson M.A., James N.L., Latta S.E., Nerem R.M., Berk B.C., Harrison D.G. 1996. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circulation Research*. **79: 984-991.** In Xei-guo Z., Shan L., Le-qing L., Hui Y., Ting F., Jiang-hua Z. 2009. Vascular oxidative stress increases dendritic cell adhesion and transmigration induced by homocysteine. *Cellular Immunology*. **254: 110-116.**

Cortex C., Motti C. 2001. MTHFR gene polymorphisme, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition*. **4**: 493-497. In Levasseur R. 2009. Tissu osseux et hyperhomocystéinémie. *Revue du Rhumatisme*. **76**: 390-396.

Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T. 1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology Medicine*. **27 (11-12)**: 1151-1163.

De Bree A., Verschuren W.M., Kromhout D., Kluijtmans L.A., Blom H.J. 2002. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacological Reviews*. **54**: 599-618.

Delattre J., Durand G., Théron P., Jardillier J.C. 2003. Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. *Médecine-sciences Flammarion Paris*. **59-81**.

Delattre J., Beaudeau J.L ; Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. **114-167**.

Demple B. 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annual Review Genetics*. **25**: 315-337.

Demuth K., Druant S., Paul J.L., Moatti N. 2000. Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *Médecine/sciences*. **16** : 1081-1090.

De Vaflery A., Fritsch C., Guimbert F., Pauget B., Coeurdassier M., Crini N *et al.*, 2009. Utilisation et intérêt des escargots et des mammifères pour la bioindication de la qualité des sols. *Étude et Gestion des Sols*. **16** : 203-217.

Duranteau J. 2008. Conséquences cliniques du stress oxydant. *Réanimation*. (6p). (communication Hors-série 3, 5, 6)

Ducros V., Favier A. 2004. Métabolisme du sélénium. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale-*

Endocrinologie. 1: 19-28.

El Bouchti I., Sordet C., Kuntz J.L., Siblia J. 2008. Une athérosclérose sévère au cours d'une polyarthrite rhumatoïde : rôle de l'hyperhomocystéinémie ? ***Revue de Rhumatisme. 75 : 684-685.***

Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. ***Mutation. Review. 339: 37-59.***

Favier A et Caillat D.1977. Determination of urinary alpha-keto-gamma-methylthiobutyric acid in hyperhomocysteinemia by use of gas chromatography and flame photometry. ***Clinica Chimica Acta. 79: 419-423.*** In Guillard J.C., Favier A., Potier de Courcy G., Galan P., Hercberg S. 2003. L'hyperhomocystéinémie: facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1-Données fondamentales. ***Pathologie Biologie. 101-110.***

Favier A. 1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. ***Annales de Biologie Clinique. 55 (1) : 9-16.***

Favier A. 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. ***L'actualité chimique. 108-115.***

Ferreira M.V.R., Alencastro A.C.R., Hermes-Lima M. 2003. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in fresh-water snails *Biomphalaria tenagophila*. ***Can.J.Zool. 81: 1239-1248.***

Floche L., Gunzler W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. ***Methods in Enzymology. 105: 114-121.*** In Gueye P.M. 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, spécialité : Biochimie, université Louis Pasteur-Strasbourg I. Institut Gilbert Laustriat. UMR CNRS 7175-LC1-Faculté de Pharmacie. France. (244 p).

Fukunaga K. 1998. A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. ***Biomedical Chromatography. 12: 300-393.***

Gomot A. 1998. Biochemical composition of Helix snails: influence of genetic and physiopathological factors. *Journal of Mollusca. Studies.* **64: 173-181.**

Grune T., Blasing I.E., Sitte N., Roloff R., Davies K.J.A. 1998. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *Journal Biology Chemistry.* **273: 10857-10862.**

Gueye P.M. 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, spécialité : Biochimie, université Louis Pasteur-Strasbourg I. Institut Gilbert Laustriat. UMR CNRS 7175-LC1-Faculté de Pharmacie. France.(244 pages).

Guilland J.C., Favier A., Potier de Courcy G., Galan P., Hercberg S. 2003. L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1-Données fondamentales. *Pathologie Biologie.* **51: 101-110.**

Hao L., Ma J., Zhu J., Stampfer M.J., Tian Y., Willett W.C *et al.*, 2007. High prevalence of hyperhomocysteinemia in Chinese adults is associated with low folate, vitamin B12, and vitamin B6 status. *Journal of Nutrition.* **137: 407-413.**

Harmon D.L., Shields D.C., Woodside J.V., Mc Master D., Yarnell J.W., Young I.S *et al.*, 1999. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genetic Epidemiology.* **17: 298-309.**

Heider I., Lehmsiek V., Lenk T., Muller T., Storch A. 2004. Dopaminergic neurotoxicity of homocysteine and its derivatives in primary mesencephalic cultures. *Journal of Neural Transmission. Suppl:* **1-13.**

Huang R.F.S., Huang S.M., Lin B.S., Wei J.S., Liu T.Z. 2001. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sciences.* **68: 2799-2781.** In Goth L., Vitai M. 2003. The effects on hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients. *Free Radical Biology Medicine.* **35 (8): 882-888.**

Iguchi S.M.M., Aikawa T., Matsumoto J.J. 1982. Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Com.Biochem.Physiol.* **72A (3): 571-573.**

Iqbal M., Som D.S., Yasumesa O. 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in doly malemia: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocity. *Pharmacology Toxicology.* **92: 33-38.**

Jakubowski H. 2006. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *Journal of Nutrition.* **136: 1714-1749.**

James C.K., Jones M.W., Pudek M.R. 1997. Homocysteine levels in patients on phenytoin therapy. *Clinical Biochemistry.* **30: 647-649.**

Janosik M., Kery V., Gaustadnes M., Maclean K.N., Kraus J.P. 2001. Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence of two catalytically active conformations involving an auto-inhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry.* **40: 10625-10633.**

Kang S., Wong P.W., Malinow M.R. 1992. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for occlusive vascular disease. *Annual Review Nutrition.* **12: 279-298.** In Buyscharet M., Hermans M.P. 2003. Comment je traite et prends en charge une hyperhomocystéinémie. *Flammarion Médecine-Sciences-Journée de diabétologie.* **230-235.**

Kchock K., Omezzine A., Rebhi L., Belkahla R., Belhadjmbarek I., Mkhimini A et al., 2007. Les conditions pré-analytiques du dosage de l'homocystéine plasmatique totale : variations postprandiales en fonction du génotype C677T MTHFR et stabilité en fonction de l'anticoagulant. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* **22 : 319-324.**

Koechlin-Ramontxo C. 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* **20: 165-177.**

Lefèvre G., Beljean-Leymarie M., Beyerle F., Bonnefont-Rousselot D., Cristol J.P., Thérond P et

al., 1998. Évaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique*. **56 (3) : 305-319.**

Levine R.L., William J.A., Stadtman E.R., Shacter E. 1994. Carbonyls assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. **233: 346-347.**

Malliaraki N., Mpliamplias D., Kampa M., Perakis K., Margioris A.N., Castanas E. 2003. Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. *Biology Medicine Clinical Nephrology*. **4: 4p. (mettre le nb de la 1 et la dernière page)**

Miller J.W., Green R., Mungas D.M., Reed B.R., Jagust W.J. 2002. Homocysteine, vitamin B6, and vascular disease in AD patients. *Neurology*. **58: 1471-1475.**

Miner S.E.S., Evroski J., Cole D.E.C. 1997. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clinical Biochemistry*. **30: 189-201.** In Guillard J.C., Favier A., Potier de Courcy G., Galan P., Hercberg S. 2003. L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1-Données fondamentales. *Pathologie Biologie*. **51 : 101-110.**

Moat S.J., Lang D., Mc Dowell J.F.W., Clarke Z.L., Madhavan A.K., Goodfellow J. 2004. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition Biochemistry*. **15: 64-79.**

Montagnier L., Olivier R., Pasquier C. 1998. Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative disease. *Marcel Dekker, New-York.*

Mudd S.H., Ebert M.H, Scriver C.R. 1980. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism*. **29: 707-720.** In Guillard J.C., Favier A., Potier de Courcy G., Galan P., Hercberg S. 2003. L'hyperhomocystéinémie: facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1-Données fondamentales. *Pathologie Biologie*. **51 : 101-110.**

Mudd S.H., Finkelstein J.D., Refsum H., Ueland P.M., Malinow M.R., Lentz S.R *et al.*, 2000. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arteriosclerosis*

***Thrombosis and Vascular Biology.* 20: 1704-1706.**

Namour F., Olivier J., Abdelmouttaleb I., Adjalla C., Debard R., Salvat C *et al.*, 2001. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. ***Blood.* 97: 1092-1098.**

Namour F., Helfer A.C., Quadros E.V., Alberto J.M., Bibi H.M., Orning L *et al.*, 2003. Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. ***British Journal of Haematology.* 123: 915-920.**

Oberley L.W., Spitz D.D. 1985. Nitroblue tetrazolium. In “ Handbook of methods for oxygen radical research”. Greenwald B.A.Ed°. CRC Press Boca Raton 217220. In Gueye P.M. 2007. Phénotypes majeurs de l’haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l’hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, spécialité : Biochimie, université Louis Pasteur-Strasbourg I. Institut Gilbert Laustriat. UMR CNRS 7175-LC1-Faculté de Pharmacie. France. (244 p).

Osea da Saliva M.A., Zezzi Arruda M.A. 2006. Mechanization of the Bradford reaction for the spectrophotometric determination of total proteins. ***Analytical Biochemistry.* 351 : 155-157.**

Otsuka-Fuchino., Watanabe Y., Hirakawa C., Tamiya T., Matsumoto J.J., Tasuchiya T. 1992. Bactericidal action of glycoprotein from the body surface mucus of giant african snail. ***Comp.Biochem.Physiol.* 101C (3) : 607-613.**

Paglia D.E., Valentine W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. ***Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 70 (1): 158-169.** In Gueye P.M. 2007. Phénotypes majeurs de l’haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l’hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, spécialité : Biochimie, université Louis Pasteur-Strasbourg I. Institut Gilbert Laustriat. UMR CNRS 7175-LC1-Faculté de Pharmacie. France. (244 p).

Patel R.P., Moellering D., Murphy-Ullrich J., Jo H., Beckman J.S., Darley-Usmar V.M. 2000. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. ***Free Radical Biology***

Medicine. 28: 1780- 1794.

Perez F. P., Ilie J.I., Zhou X. 2007. Pathomolecular effects of homocysteine on the aging process: A new theory of aging. ***Medical Hypothesis. 69: 149-160.***

Pincemail J. 1998. Espèces oxygénées en médecine humaine : une approche didactique. ***Vaisseaux, Cœur, Poumon. 3 : 133-138.***

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. ***Vaisseaux, Cœur, Poumon. Vol 4, N° 5.***

Pincemail J., Lecompte J., Collart E., Castiaux J.P., Defraigne J. 2001. Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. ***Vaisseaux, Cœur, Poumon. 4 : 148-154.***

Pirame S.S.L. 2003. Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit-Gris (*Helix aspersa*) : reproduction expérimentale. Thèse de doctorat, spécialité : vétérinaire, université Paul-Sabatier de Toulouse, France. (97 pages)

Pons F., Koenig M., Michelot R. 1999. The bronchorelaxant effect of helicidine, a *Helix pomatia* extract, involves prostaglandin E2 release. ***Pathologie biologique review. 47(1):73-80.***

Pouget J.P. 2000. Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées. Thèse Grenoble, France. In Gueye P.M. 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, spécialité : Biochimie, université Louis Pasteur-Strasbourg I. Institut Gilbert Laustriat. UMR CNRS 7175-LC1-Faculté de Pharmacie. France. (244 p).

Prior R.L., Cao G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. ***Free Radical Biology Medicine. 27 (11-12): 1173-1181.***

Pritchard K.A Jr., Groszek L., Smalley D.M., Sessa W.C., Wu M *et al.*, 1995. Native low density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion.

***Circulation Research*. 77: 510-518.**

Quiun C.T., Griener J.C., Bottiglieri T., Hyland K., Farrow A., Kamen B.A. 1997. Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology*. **15: 1800-2806.**

Ramos-Vasconcelos G.R., Hermes-Lima M. 2003. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *Journal Experimental Biology*. **206: 675-685.**

Ramos-Vasconcelos G.R., Cardoso L.A., Hermes-Lima M. 2005. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. **140: 165-174.**

Refsum U., Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E. 1998. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review Medicine*. **49: 31-63.** In Guillard J.C., Favier A., Potier de Courcy G., Galan P., Hercberg S. 2003. L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1-Données fondamentales. *Pathologie Biologie*. **51: 101-110.**

Richard M.J., Guiraud P., Meo J., Favier A. 1992. High-performance liquid chromatographic separation of malonaldehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *Journal of Chromatography*. **577: 9-18.**

Roubnoff R., Dellaripa P., Nadeau M.R., Abad L.W., Muldoon B.A., Selhub J *et al.*, 1997. Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatoid*. **40: 718-722.**

Ryter S.W., Kvam E., Tyrrell R.M. 2000. Heme oxygenase activity. Current methods and applications. *Methods Biology*. **99: 369-391.**

Sen C.K. 2001. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling : Introduction. *Medicine Science Sports Exercise*. **33 (3) : 368-370.**

Sharma M., Rai S.K., Tiwari M., Chandra R. 2007. Effect of hyperhomocysteinemia on

cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in wistar rats. *European Journal of Pharmacology*. **574**: 49-60.

Sorg O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*. **327**: 649-662.

Stadtman E.R. 1990. Metal-ion catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology Medicine*. **9 (4)**: 315-325.

Stadtman E.R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acids residus in proteins by metal-catalyzed reactions. *Annual Review Biochemistry*. **62**: 797-821.

Steghens J.P., Van Kappel A.L., Denis I., Collombel C. 2001. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC- UV measurement of total and free Malone-dialdehyde in human plasma or serum. *Free Radical Biology Medicine*. **15 (31)**: 242-249. In Jalabert A., Steghens J.P., Barbotte E., Martelli N., Pigue C., Florent M *et al.*, 2006. Evaluation des phénomènes de peroxydation lipidique dans les solutés de nutrition parentérale administrés aux enfants prématurés. *Nutrition clinique et métabolisme*. **20** : 61-67.

Stern F., Berner Y.N., Polyak Z., Komarnitsky M., Sela B.A., Hopp M *et al.*, 2004. Homocysteine effect on protein degradation rates. *Clinical Biochemistry*. **37** : 1002-1009.

Sunden S.L., Renduchintala M.S., Park E.I., Miklasz S.D., Garrow T.A. 1997. Betaine-homocysteine méthyltransférase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **345**: 171-174.

Sydow K., Munzel T. 2003. ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis*. **Suppl. 4**: 41-51.

Szeto Y.T., Collins A.R., Benzie I.F.F. 2002. Effect of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutation Research*. **500**: 31-38.

Takahashi K., Avissar N., Whitin J., Cohen H. 1987. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme.

Archives of Biochemistry and Biophysics. **256 (2): 677-686.**

Toader-Williams A., Golubkina N. 2009. Investigation upon the Edible Snail's Potential as Source of Selenium for Human Health and Nutrition Observing its Food Chemical Contaminant Risk Factor with Heavy Metals. *Bulletin UASVM Agriculture*. **66 (2) 495-499.**

Toreilles J., Guerin M.C. 1995. Free radicals and natural or synthetic chemiluminescent systems. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la société de Biologie et ses Filiales*. **189 (6): 1149-1170.**

Tortorano A.M., Cabrini E., Viviani M.A. 1979. Sensibilité *in vivo* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI. En gélose et méthode des disques. *Bull. Soc.Fr.Myc.Med*. **8: 69-74.**

Tsai J.C. 1994. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proceedings of National Academy of Sciences .USA*. **91: 6369-6373.**

Underti N. D. 2003. Folic Acid Says NO to Vascular Diseases. *Nutrition*. **19: 686–92.**

Urso M.L., Clarkson P.M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. **189: 41-54.**

Valkonen M., Kuusi T. 1997. Spectrophotometry assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *The Journal of Lipid Research*. **38: 823-833.** In Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. 1999. L'évolution du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*. **Vol 4, N°5.**

Van Beynum I.M., den Heijer M., Thomas C.M., Afman L., Oppenraay -Van Emmerzaal D., Blom H.J. 2005. Total homocysteine and its predictors in Dutch children. *American Journal of Clinical Nutrition*. **81: 1110-1116.**

Wang X.L., Duarte N., Cai H., Adachi T. ; Sim A.S., Cranney G *et al.*, 1999. Relationship between total plasma homocysteine, polymorphism of homocysteine metabolism related

enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Arteriosclerosis*. **146: 133-140**. In Chen M. 2009. Influence des donneurs de méthyle et du métabolisme de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI: études de population et modèle expérimental chez le raton carencé. Thèse de doctorat, spécialité: Biologie cellulaire-Nutrition, université Henri Poincaré-Nancy I, Faculté de médecine. France. (157 p).

Wilcken D.E., Wang X.L., Adachi T., Hara H., Duarte N., Green K *et al.*, 2000. Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinurie: possible relevance to cardiovascular risk. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. **20: 1199-1202**.

Winder B., Leblhuber F., Frick B., Laich A., Artner-Dworzak E., Fuchs D. 2002. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. **109: 1145-1152**.

Woo C.W.H., Prathapasinghe G.A., Siow Y.L., Karmin O. 2006. Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat : Protective effect of folic acid supplementation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1762 : 656-665**.

Yalçinkaya S., Ünlüçerçi Y., Uysal M. 2007. Methionine-supplementation diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. *Experimental and Toxicologic pathology*. **58: 455-459**.

Yalçinkaya S., Ünlüçerçi Y., Giriş M., Olgaç V., Doğru-Abbasoğlu S., Uysal M. 2009. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: Protective effect of taurine. *Nutrition*. **25: 436-444**.

Yamamoto M., Hara H., Adachi T. 2000. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **486: 159-162**.

Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vasquez-Vivar *et al.*, J. 2003. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from éthidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free*

Radical Medicine. 34: 1359-1368.

Zhloba A.A., Blashko E.L. 2004. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection. *Journal of Chromatography B. 800: 275-280.*

Annexes

Annexe 1

Composition des réactifs utilisés pour la préparation de la gamme étalon des protéines

Réactif de Bradford

Bleu de Comassie (Brillant bleu G-250)	3,5 mg
Ethanol 95°	3,5 ml
Acide phosphorique 85%	7,9 ml
Eau distillée	100 ml

La solution est mélangée pendant 15 minutes jusqu'à la solubilisation complète du CBBG ; le mélange est filtré puis stocké dans un flacon sombre.

Tampon phosphate (pH =7,2)

Potassium phosphate dihydrogène	1,3 g
Eau distillée	50 ml

Ajuster le pH du tampon avec une solution de NaOH de 100 mM ;

Compléter le volume du tampon jusqu'à 100 ml par l'eau distillée.

BSA (sérum bovine albumine)

BSA	10 mg
Tampon phosphate	.50 ml

pH = 7,2 .

Annexe 2

Composition du milieu de culture utilisé pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des gastéropodes

Milieu Mueller-Hinton

Infusion de viande	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17

pH = 7,4 (ajusté par une solution de NaOH 3N)

Annexe 3

Méthodes de calcul de la concentration du MDA et des protéines totales plasmatiques et tissulaires

Les concentrations du MDA et des protéines totales sont calculées selon l'équation suivante :

$$Y = a \cdot x + b$$

$$[\text{MDA}] = [(A_{530} - b) / a] \cdot df$$

$$[\text{PrT}] = [(A_{595} - b) / a] \cdot df$$

sachant que :

[MDA]: Concentration de MDA dans l'échantillon;

[PrT] : Concentration des protéines totales dans l'échantillon;

A_{530} = Absorbance à 530 nm de l'échantillon;

A_{595} = Absorbance à 595 nm de l'échantillon;

df = facteur de dilution de l'échantillon;

Annexe 4

Résultats statistiques

MDA plasmatique

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
M	6	53,9487	14,8397	6,0583
MHE	6	46,9293	4,5146	1,8431

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
M	8,905	5	,000	53,9487	38,3754	69,5220
MHE	25,462	5	,000	46,9293	42,1915	51,6671

MDA hépatique

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
M	6	15,9133	6,1035	2,4917
MHE	5	13,6244	6,1163	2,7353

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
M	6,386	5	,001	15,9133	9,5081	22,3185
MHE	4,981	4	,008	13,6244	6,0300	21,2188

Prptéines totales plasmatiques

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
M	6	16,7773	1,7130	,6993
MHE	6	15,9563	1,3249	,5409

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
M	23,990	5	,000	16,7773	14,9796	18,5750
MHE	29,500	5	,000	15,9563	14,5659	17,3468

Protéines totales hépatiques

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
M	5	19,1824	10,1065	4,5198
MHE	6	21,2950	7,2603	2,9640

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
M	4,244	4	,013	19,1824	6,6335	31,7313
MHE	7,185	5	,001	21,2950	13,6758	28,9142

Les coefficients de corrélations entre MDA plasmatique et hépatique

Correlations

		CP	MP	MHEP	CT	MT	MHET
CP	Pearson Correlation	1,000	,931**	-,481	-,781	,646	-,184
	Sig. (2-tailed)	,	,007	,335	,119	,166	,768
	N	6	6	6	5	6	5
MP	Pearson Correlation	,931**	1,000	-,352	-,607	,678	,158
	Sig. (2-tailed)	,007	,	,494	,278	,139	,800
	N	6	6	6	5	6	5
MHEP	Pearson Correlation	-,481	-,352	1,000	,574	-,052	,918*
	Sig. (2-tailed)	,335	,494	,	,312	,923	,028
	N	6	6	6	5	6	5
CT	Pearson Correlation	-,781	-,607	,574	1,000	-,406	,676
	Sig. (2-tailed)	,119	,278	,312	,	,498	,210
	N	5	5	5	5	5	5
MT	Pearson Correlation	,646	,678	-,052	-,406	1,000	,109
	Sig. (2-tailed)	,166	,139	,923	,498	,	,861
	N	6	6	6	5	6	5
MHET	Pearson Correlation	-,184	,158	,918*	,676	,109	1,000
	Sig. (2-tailed)	,768	,800	,028	,210	,861	,
	N	5	5	5	5	5	5

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Les coefficients de corrélation entre les protéines totales plasmatique et hépatique

Correlations

		CP	MP	MHEP	CT	MT	MHET
CP	Pearson Correlation	1,000	,355	,532	-,534	-,277	-,397
	Sig. (2-tailed)	,	,490	,277	,354	,652	,436
	N	6	6	6	5	5	6
MP	Pearson Correlation	,355	1,000	,772	-,879*	,748	-,736
	Sig. (2-tailed)	,490	,	,072	,050	,146	,095
	N	6	6	6	5	5	6
MHEP	Pearson Correlation	,532	,772	1,000	-,988**	,610	-,547
	Sig. (2-tailed)	,277	,072	,	,002	,275	,262
	N	6	6	6	5	5	6
CT	Pearson Correlation	-,534	-,879*	-,988**	1,000	-,543	,975**
	Sig. (2-tailed)	,354	,050	,002	,	,344	,005
	N	5	5	5	5	5	5
MT	Pearson Correlation	-,277	,748	,610	-,543	1,000	-,374
	Sig. (2-tailed)	,652	,146	,275	,344	,	,535
	N	5	5	5	5	5	5
MHET	Pearson Correlation	-,397	-,736	-,547	,975**	-,374	1,000
	Sig. (2-tailed)	,436	,095	,262	,005	,535	,
	N	6	6	6	5	5	6

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Résumé

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet antioxydant et antimicrobien de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa*. Pour atteindre nos objectifs, trois étapes principales ont été réalisées :

- * Soumission des rats à un régime alimentaire enrichi en L-Méthionine pour induire un stress oxydant (**400mg/kg de poids du rat/jour**).

- * Traitement des rats par l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* (**100mg/kg de poids du rat/jour**) associée à une dose élevée de la L-Méthionine.

- * Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa* vis-à-vis de trois souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 13), deux souches fongiques (*Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74, *Trichophytum rubrum* CIP 2043.92) et une souche levurienne *Candida albicans* UMIP 88465 en utilisant la méthode des disques en papier.

Les résultats des dosages du MDA (malonyldialdéhyde) et des protéines totales ont montré :

- * D'une part, une augmentation des taux du MDA hépatique (**$p \leq 0,001$**) et des protéines totales plasmatiques (**$p \leq 0,0001$**) chez les rats recevant une dose élevée de la L-Méthionine, expliquant ainsi le déroulement des phénomènes de la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines cellulaires.

- * D'autre part, une diminution des taux du MDA plasmatique (**$p \leq 0,0001$**) et hépatique (**$p \leq 0,001$**), et des protéines totales plasmatiques (**$p \leq 0,0001$**) suite au traitement des rats hyperhomocystéinémiques par l'homogénat des escargots. Cela nous a permis de conclure que l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* possède des propriétés antioxydantes.

Le test microbiologique a révélé une activité antibactérienne des extraits organiques bruts des escargots préparés à partir de l'eau distillée ; aucune activité antifongique n'a été cependant détectée.

Escherichia coli ATCC 25922 s'est révélée la plus sensible des trois bactéries tests.

La caractérisation préliminaire des molécules antibactériennes des extraits organiques bruts de l'escargot *Helix aspersa* nous a permis de conclure qu'elles peuvent être probablement de nature protéique libre et/ou liée.

Mots clés :

L-Méthionine, hyperhomocystéinémie, *Helix aspersa*, extraits organiques bruts, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

ملخص

من خلال هذه الدراسة، أردنا الاهتمام بكشف النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للكائنات الحية المجهرية عند مستخلص الحلزونات.

من أجل تحقيق أهدافنا، قمنا بإجراء ثلاث مراحل أساسية:

- إخضاع الجرذان لنظام غذائي مشبع ب : L- ميثيونين (400 ملغ/ كلغ من كتلة الفأر/ اليوم) من أجل الحصول على حالة أكسدة.

- معالجة الجرذان بمستحضر الحلزون *Helix aspersa* (100 ملغ/ كلغ من كتلة الفأر/ اليوم) مصحوبا بجرعة كبيرة من L- ميثيونين

- دراسة النشاط المضاد للكائنات الحية المجهرية للمستخلصات العضوية الخام للحلزونات بالنسبة لثلاث سلالات

بكتيرية (*Escherichia coli* ATCC 25922، *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)

13 (*Pseudomonas aeruginosa*)، سلالتين فطريتين متعددي الخليا

(*Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74 ، *Trichophytum rubrum* CIP 2043.92) و سلالة فطرية

وحيدة الخلية (*Candida albicans* UMIP 88465) ، و ذلك من خلال استعمال طريقة الأقراص الورقية.

أظهرت نتائج تحاليل ال MDA (المالونيل دي أدهيد) و البروتينات الكلية :

- من جهة، ارتفاع في معدل ال MDA الكبدى ($P \leq 0.001$) و البروتينات الكلية البلازمية ($P \leq 0.0001$) عند

الجرذان المعرضة لجرعة عالية من ال L- ميثيونين، مما يدل على حدوث تفاعلات الأكسدة الليبيدية و الأكسدة البروتينية.

- من جهة أخرى، انخفاضا في معدل ال MDA البلازمي ($P \leq 0.0001$) والكبدى ($P \leq 0.001$) بالإضافة الى

البروتينات الكلية البلازمية ($P \leq 0.0001$) عند الجرذان المريضة المعالجة بمستحضر الحلزونات.

سمحت لنا هذه النتائج باستخلاص أن مستحضر الحلزونات يملك خاصية النشاط المضاد للأكسدة.

أظهرت الدراسة الميكروبيولوجية وجود نشاط مضاد للبكتيريا بالنسبة للمستخلصات العضوية الخام للحلزونات

المحضرة باستعمال الماء المقطر، و استنتج أن *Escherichia coli* ATCC 25922 هي أكثر البكتيريا

حساسية لهذا النشاط ضد البكتيري.

سمحت الدراسة الأولية للمضادات البكتيرية للمستخلصات العضوية الخام للحلزون *Helix aspersa*

باستنتاج أن هذه المضادات قد تكون عبارة عن بروتينات حرة أو مرتبطة.

الكلمات المفتاحية :

L- ميثيونين , ايبار أوموسيتايناميا , *Helix aspersa*, المستخلصات العضوية الخام , النشاط المضاد للأكسدة ,

النشاط المضاد للكائنات الحية المجهرية.

Summary

In this study, we took an interest in the evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Helix aspersa* snail homogenate. In order to reach our goals, three principal stages were undertaken:

- * Submission of rats at a high L-Methionine diet (**400mg/kg of the weight of the rat/day**) in order to induce an oxidative stress.

- * Treatment of rats by *Helix aspersa* snail homogenate (**100mg/kg of the weight of the rat/day**) associated with a high dose of the L-Methionine.

- * Evaluation of the antimicrobial activity of *Helix aspersa* snail crude organic extracts against three bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 13), two fungal strains (*Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74, *Trichophyllum rubrum* CIP 2043.92) and one strain of yeast (*Candida albicans* UMIP 88465) by the use of paper disk assay method.

The results of MDA and total protein mixtures showed that:

- * On one hand, an increase of hepatic MD (**$p \leq 0,001$**) and plasmatic total protein levels (**$p \leq 0,0001$**) on rats that receiving a high dose of the L-Methionine, explaining thus the proceedings of lipid peroxidation phenomenons and the cellular proteins oxidation.

- * On the other hand, a decrease of the levels of plasmatic (**$p \leq 0,0001$**) and hepatic MDA (**$p \leq 0,001$**), and plasmatic total proteins (**$p \leq 0,0001$**) following treatment of hyperhomocysteinemic rats with the snails homogenate. This allowed us to conclude that the *Helix aspersa* snail homogenate has antioxidant properties.

The microbiological test revealed an antibacterial activity of snails crude organic extracts prepared with distilled water.

Escherichia coli ATCC 25922 was revealed as the most sensitive of the three test-bacteria. No anti fungal activity was determined.

The preliminary characterization of antibacterial molecules of *Helix aspersa* snail crude organic extracts allowed us to conclude that they can probably have protein linked and/or free nature.

Key words:

L-Methionine, hyperhomocysteinemia, *Helix aspersa*, crude organic extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity.