



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI  
CONSTANTINE

N° d'ordre: 11/D3C/2017

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° de série : 01/BioA/2017

## Thèse

Présentée pour l'obtention

Du Diplôme de Doctorat de 3<sup>eme</sup> cycle LMD

En *Biotechnologie, Biologie et Environnement*

*Option : Immuno-oncologie*

Par

MEBIROUK Romeila

### **Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et anti-angiogénique**

#### **Membres du jury :**

Présidente : Mme TEBIBEL Soraya

Professeur, U. des frères Mentouri Constantine.

Directrice de thèse : Mme NAIMI Dalila

Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie  
Taoufik KHAZNADAR Constantine.

Examineurs :

Mr AZARKAN Mohamed

Professeur, Faculté de médecine, U. Libre de Bruxelles.

Mr ZELLAGUI Ammar

Professeur, U. Larbi Ben Mhidi, Oum el Bouaghi.

Mr BOUDDAH A. Nacer

Professeur Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie  
Taoufik KHAZNADAR.

Mme El OUAR Ibtiçème

Maitre de conférences A U. des frères Mentouri  
Constantine.

Soutenue le 09/03/ 2017

Année universitaire: 2016 - 2017

A scroll with text on a parchment background. The scroll is unrolled, showing the text in the center. The parchment is a light beige color with some texture and shadows. The scroll is held by a wooden handle on the right side.

AVANT TOUT,  
JE REMERCIE ALLAH;  
LE TOUT  
MISÉRICORDIEUX, LE  
TRÈS MISÉRICORDIEUX,  
L'UNIQUE, LE PLUS  
PUISSANT, POUR SON  
GUIDE, SON AIDE QUI A  
PERMIS DE MENER À  
BIEN CE TRAVAIL.

## **REMERCEMENTS**

*A l'issue de la rédaction de cette thèse, je suis convaincue qu'un travail de recherche est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail Doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes très généreuses qui m'ont permis de progresser dans ma recherche.*

*En premier lieu, je tiens à remercier ma Directrice de thèse Le Professeur **Dalila NAIMI**, Directrice de l'équipe de Biologie, Physiologie Cellulaire et Moléculaire, Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ses multiples conseils. Je tiens également à lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail.*

*Je tiens également à remercier Le Professeur **TEBIBEL Soraya de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.***

*Je souhaiterais exprimer ma gratitude à monsieur **AZARKAN Mohamed** pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et pour l'ambiance de travail très agréable qu'il a su créer grâce à sa très grande ouverture d'esprit. Je le remercie également pour son accueil chaleureux au sein de son unité de Chimie des Protéines Faculté de Médecine Université Libre de Bruxelles et pour l'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de cette recherche ; sans vous ma recherche serait certainement moins riche...*

*Mes remerciements les plus sincères vont aux professeurs : Mr **ZELLAGUI Ammar**, Mr **BOUDDAH Abd Elnacer** et Mme **EL OUAR Ibtissem** d'avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.*

*Ma reconnaissance va également à Monsieur **ANTONICELLI Frank** pour sa rigueur, sa patience et sa bonne humeur et de m'avoir permis de réaliser une partie de ce travail dans son laboratoire ainsi que le temps qu'il a accordé pour nous faire des corrections. Je tiens également à remercier sa petite équipe : **Meriem et Sébastien.***

*Mes remerciements vont également à mon amie **Housna Zettal** pour son aide précieuse à chaque fois que je 'ai sollicité ainsi que pour ses multiples encouragements, notamment lors du deuxième stage.*

*Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance à l'équipe de Chimie des protéines, ULB : à **Nasiha M'Rabet, Rachida EL Mahyaoui et Laetitia Bolle**, et en particulier **Nasiha**, qui a accepté de me diriger et qui a contribué dans mon encadrement lors de mon stage, à **Monsieur Madaci** pour m'avoir toujours accueillie très chaleureusement au sein de son département ainsi que pour son soutien, à tous mes amis doctorants qui m'ont aidée de manière bénévole en particulier les chimistes **Mohamed et Ilhem**, et les biologistes **Fateh, Sedik, Wafa, Amira, Anissa, Narimène**,... (Trop nombreux pour être tous cités ici).*

*Aux personnels du laboratoire d'Analyses Biologiques Mr **Benouar et Mr Laraba** et notamment l'ingénieur du labo **Samia Bendamen** merci de m'avoir supporté durant ces 5 ans je te souhaite du courage et plein de réussite pour ton doctorat.*

# DÉDICACES

## *Je dédie ce travail à*

*Ma mère Férial, qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur.*

*Merci pour être sacrifiée pour que ses enfants grandissent et prospèrent. Que Dieu la protège et lui donne bonne santé et qu'elle trouve ici la preuve de ma reconnaissance infinie.*

*Mon père Djamel, pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.*

*Mes sœurs Safa, Maya et Daya ainsi que mon frère Mizou pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragements incessants, d'être coopératif et d'assumer à ma place certaines de mes responsabilités familiales.*

*Mon mari Sofiane d'être toujours à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie par son amour et sa tendresse ; j'espère qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.*

*Ma belle sœur Assia, pour son soutien, sa gentillesse et sa sympathie, pendant cette thèse que Dieu la protège ainsi que ses enfants et leur donne une vie pleine de réussite et de bonheur.*

*À ma famille,*

*À tout mes amis.*

# TABLE DES MATIERES

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

<b>I. Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Revue bibliographique.....</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre 1 : <i>Helix aspersa</i>.....</b>	<b>5</b>
1- Présentation et classification de l'espèce <i>Helix aspersa</i> .....	5
2- Morphologie de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	5
2-1- La coquille.....	5
2-2- Le pied.....	6
3- Anatomie de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	6
3-1- Le système digestif.....	6
3-2- Le système Nerveux.....	6
3-3- Le système circulatoire.....	7
3-4- L'appareil reproducteur.....	7
4- Les différents types de glandes d' <i>Helix aspersa</i> sécrétant le mucus.....	8
5- Composition biochimique et qualité nutritionnelle de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	9
<b>Chapitre 2 : L'inflammation.....</b>	<b>10</b>
<b>1- Définition de la réaction inflammatoire et ses principaux effecteurs.....</b>	<b>10</b>
1-1- L'inflammation aigue.....	12
1-1-1- La reconnaissance des signaux de danger.....	12
1-1-2- Formation du foyer inflammatoire.....	13
1-1-3- Signalisation et réaction inflammatoire.....	14
1-1-4- Résolution de l'inflammation.....	15
1-2- L'inflammation chronique.....	17
2- Maladies inflammatoires.....	17
3- Thérapies anti-inflammatoires et mode d'action des molécules thérapeutiques....	18
4- Inflammation et cancer.....	20

<b>Chapitre 3 : L'angiogénèse.....</b>	<b>23</b>
1- Définition de l'angiogénèse.....	23
2- L'angiogénèse physiologique.....	23
2-1- Régulation moléculaire de l'angiogénèse.....	23
2-2- Mécanismes de l'angiogénèse physiologique.....	25
3- L'angiogénèse pathologique .....	26
3-1- Définition.....	26
3-2- L'angiogénèse tumorale.....	26
3-2-1 Rôle de l'inflammation dans l'angiogénèse tumorale.....	28
3-2-2 Rôle des métalloprotéases dans l'angiogénèse.....	28
4- Ciblage de l'angiogénèse dans les thérapies anticancéreuses.....	30
<b>Chapitre 4 : Cancer.....</b>	<b>31</b>
1- Généralités.....	31
1-1- Définition du cancer.....	31
1-2- Formation des tumeurs et l'invasion tumorale.....	31
2- Bases moléculaires de la cancérogénèse.....	32
2-1- Etapes du développement d'un cancer.....	32
2-2- Processus de transformation tumorale.....	33
a- Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs.....	33
b- Activation des proto-oncogènes.....	34
3- Thérapies anticancéreuses.....	35
4- Cibles des thérapies anticancéreuses.....	36

<b>III. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre 1 : Extraction et étude physico-chimique des extraits d'<i>Helix aspersa</i>.....</b>	<b>37</b>
1-1- Matériel biologique.....	37
1-2- Préparation de l'homogénat d' <i>Helix aspersa</i> .....	37
1-3- Préparation des extraits aqueux, hydroalcoolique et organique .....	37
1-4- Test de quelques molécules.....	39
1-4-1- Dosage des protéines totales dans les deux extraits aqueux et hydroalcoolique.....	39
1-4-2- Estimation des protéines des extraits aqueux et hydroalcoolique sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	39
1-4-3- Dosage des polyphénols totaux dans les trois extraits : aqueux, hydroalcoolique et organique.....	40
1-4-4- Mise en évidence des flavonoïdes.....	41
1-4-5- Mise en évidence de l'activité hémagglutinante des extraits aqueux et hydroalcoolique.....	41
<b>Chapitre 2 : Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet protecteur de l'homogénat d'<i>Helix aspersa</i> contre l'hépatotoxicité induite par la cyclosporine A.....</b>	<b>43</b>
2-1- Matériels utilisés .....	43
2-2- Protocole expérimental.....	43
2-3- Etude biochimique.....	44
2-3-1- Homogénéisation du foie.....	44
2-3-2- Dosage des transaminases (ASAT (GTO) et ALAT (TGP)).....	44
2-3-3- Dosage du MDA.....	44
2-3-4- Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase.....	46
2-3-5- Dosage du glutathion réduit.....	46
<b>Chapitre 3 : Evaluation « <i>in vivo</i> » de l'effet anti-inflammatoire des trois extraits aqueux, hydroalcoolique et organique (modèle pulmonaire de rat).....</b>	<b>48</b>
3-1- Matériels utilisés .....	48
3-2- Induction de l'inflammation pulmonaire.....	48
3-3- Dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO).....	50
3-4- Dosage des protéines totales dans le BALF .....	50

<b>Chapitre 4 : Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet anti-tumoral des extraits aqueux, hydroalcoolique et organique .....</b>	<b>51</b>
4-1- Matériels utilisés.....	51
4-1-1- Les lignées cellulaires.....	51
4-1-2- Les milieux de culture .....	51
4-1-3- Cytokines.....	51
4-1-4- Autres produits.....	52
4-2- Evaluation de l'effet antitumoral des extraits aqueux et hydroalcoolique contre des lignées tumorales de lymphomes cutanés : Hut-78 et SeAx .....	53
4-2-1- Culture cellulaire.....	53
4-2-2- Test de toxicité <i>in vitro</i> .....	53
4-2-3- Evaluation de la condensation de chromatine et la fragmentation nucléaire par le test Hoechst .....	54
4-3- Evaluation de l'activité anti-proliférative de l'extrait hydroalcoolique et organique contre des lignées cellulaires normale et cancéreuses.....	54
4-3-1- Culture cellulaire.....	54
4-3-2- Test MTT .....	55
 <b>Chapitre 5 : Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet anti-angiogénique des extraits .....</b>	<b>56</b>
5-1- Traitement des cellules.....	56
5-2- Technique de zymographie.....	56
 <b>Chapitre 6 : Fractionnement de l'extrait protéique soluble de l'escargot <i>Helix aspersa</i> et évaluation de l'activité protéolytique et anti-proliférative des différentes fractions.....</b>	<b>57</b>
6-1- Extraction et précipitation des protéines solubles au sulfate d'ammonium.....	57
6-2- Fractionnement des protéines solubles par chromatographie échangeuse de cations en utilisant un appareillage chromatographique AKTA Start.....	57
6-3- Séparation des protéines sur gel SDS-PAGE.....	58
6-4- Evaluation de l'activité protéolytique de l'extrait C et des fractions chromatographiques.....	58
6-5- Identification des classes de protéases présentes dans l'extrait C et les fractions chromatographiques.....	58
6-6- Evaluation de l'activité anti-proliférative des extraits C et F et des différentes fractions chromatographiques.....	59
<b>Analyse statistique.....</b>	<b>59</b>

<b>IV. Résultats et Discussion.....</b>	<b>60</b>
<b>1- Résultats.....</b>	<b>60</b>
<b>Chapitre 1 : Etude physico-chimique des extraits bruts : aqueux, hydroalcoolique et organique.....</b>	<b>60</b>
1-1- Dosage des protéines totales dans les deux extraits aqueux et hydroalcoolique.....	60
1-2- Estimation des protéines des extraits aqueux et hydroalcoolique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	60
1-3- Dosage des polyphénols totaux dans les trois extraits : aqueux, hydroalcoolique et organique.....	61
1-4- Mise en évidence des flavonoïdes.....	62
1-5- Mise en évidence de l'activité hémagglutinante des extraits aqueux et hydroalcoolique.....	62
<b>Chapitre 2 : Effet protecteur <i>in vivo</i> de l'homogénat du pied d'escargot <i>Helix aspersa</i> contre la toxicité induite par la cyclosporine A.....</b>	<b>63</b>
2-1- Effet de l'homogénat sur les différentes populations sanguines.....	63
2-1-1- Comptage des cellules sanguines (leucocytes, lymphocytes et granulocytes).....	63
2-1-2- Morphologie des cellules sanguines et leurs précurseurs médullaires.....	64
2-2- Effet de l'homogénat sur le statut oxydant et anti-oxydant.....	66
2-2-1- Effet sur le taux des transaminases : ASAT (GTO) et ALAT (TGP).....	66
2-2-2- Effet sur le taux du MDA.....	67
2-2-3- Effet sur l'activité enzymatique de la catalase.....	68
2-2-4- Effet sur le taux du GSH.....	68

<b>Chapitre 3 : Effet anti-inflammatoire des trois extraits : Extrait aqueux, hydroalcoolique et organique .....</b>	<b>70</b>
3-1- Effet des trois extraits sur le taux des leucocytes.....	70
3-2- Effet des trois extraits sur l'activité des neutrophiles pulmonaires.....	72
3-3- Effet des trois extraits sur le poumon.....	73
<b>Chapitre 4 : Effet anti-tumoral des trois extraits : aqueux, hydroalcoolique et organique.....</b>	<b>77</b>
4-1-Effet antitumoral des extraits aqueux et hydroalcoolique sur des lignées tumorales de lymphome cutané (Hut-78 et SeAx).....	77
4-2-Mode d'action de l'extrait aqueux sur les deux lignées HUT-78 et SeAx.....	79
4-3-Effet anti-prolifératif des extraits hydroalcoolique et organique sur des lignées cellulaires normales et tumorales.....	80
<b>Chapitre 5 : Effet antiangiogénique des deux extraits : aqueux, hydroalcoolique.....</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre 6 : Fractionnement de l'extrait protéique soluble de la chair de l'escargot <i>Helix aspersa</i> et évaluation de ses activités protéolytique et anti-proliférative .....</b>	<b>83</b>
6-1- Extraction et précipitation des protéines solubles au sulfate d'ammonium.....	83
6-2- Fractionnement de l'extrait protéique sur Q-sepharose.....	83
6-3- Mise en évidence de l'activité protéolytique dans les fractions obtenues .....	86
6-4- Identification des protéases dans les différentes fractions.....	87
6-5- Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits et des fractions chromatographiques.....	88
<b>Discussion.....</b>	<b>91</b>
Conclusion et perspectives.....	108
Annexes.....	111
Références bibliographiques.....	117

## **Liste des figures :**

<b>Figure 1:</b> L'escargot <i>Helix aspersa</i> (Müller, 1774).....	5
<b>Figure 2 :</b> Morphologie de l' <i>Helix aspersa</i> .....	6
<b>Figure 3 :</b> Anatomie de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	8
<b>Figure 4 :</b> Etapes de la formation du foyer inflammatoire .....	13
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique de transduction du signal via le TLR.....	14
<b>Figure 6 :</b> Principaux acteurs de la phase de réparation tissulaire .....	16
<b>Figure 7 :</b> Balance entre les médiateurs pro- et anti-inflammatoires.....	17
<b>Figure 8 :</b> Schéma de synthèse de la pathogénie des maladies inflammatoires.....	18
<b>Figure 9 :</b> Structure de la cyclosporine A .....	20
<b>Figure 10 :</b> Voies liant l'inflammation au cancer.....	22
<b>Figure 11:</b> Angiogenèse physiologique et formation d'un nouveau vaisseau.....	25
<b>Figure 12 :</b> Mécanismes cellulaire et moléculaire de l'angiogenèse pathologique .....	26
<b>Figure 13 :</b> Vascularisation d'un tissu sain et d'un tissu tumoral.....	27
<b>Figure 14 :</b> implication des cellules inflammatoires dans l'angiogenèse.....	28
<b>Figure 15 :</b> Structure des MMPs.....	30
<b>Figure 16 :</b> Caractéristique d'une cellule cancéreuse.....	32
<b>Figure 17:</b> Etapes et stades du cancer.....	33
<b>Figure 18 :</b> Les deux voies apoptotiques ainsi que leurs différents effecteurs.....	34
<b>Figure 19 :</b> Quelques cibles dans la thérapie anticancéreuses.....	36
<b>Figure 20 :</b> Protocole d'extraction à partir de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	38

<b>Figure 21:</b> Test d'hémagglutination sur microplaque de titration.....	41
<b>Figure 22 :</b> Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique.....	45
<b>Figure 23 :</b> Structure du Séphadex.....	48
<b>Figure 24:</b> Schéma représentant la méthode de l'instillation intra-trachéale.....	49
<b>Figure 25 :</b> Concentration en protéines dans les deux extraits de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	60
<b>Figure 26 :</b> Profils électrophorétiques des deux extraits.....	61
<b>Figure 27:</b> Concentration en polyphénols dans les différents extraits de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	61
<b>Figure 28:</b> Résultats du test colorimétrique de la mise en évidence des flavonoïdes.....	62
<b>Figure 29:</b> Résultats du test d'hémagglutination des deux extraits aqueux et hydroalcoolique.....	62
<b>Figure 30 :</b> Effet de l'homogénat d' <i>Helix aspersa</i> sur le taux des différentes populations leucocytaires.....	64
<b>Figure 31:</b> Effet de l'homogénat d' <i>Helix aspersa</i> sur la morphologie des cellules du sang (colorées au May-Grunwald Giemsa-GX400).....	65
<b>Figure 32 :</b> Effet de l'homogénat d' <i>Helix aspersa</i> sur la morphologie des cellules médullaires (colorées au May-Grunwald Giemsa-GX400).....	66
<b>Figure 33 :</b> Effet de l'homogénat d' <i>Helix aspersa</i> sur le taux des transaminases.....	67
<b>Figure 34 :</b> Effet de l'homogénat d' <i>Helix aspersa</i> sur le taux du MDA hépatique.....	68
<b>Figure 35 :</b> Effet de l'homogénat d' <i>Helix aspersa</i> sur quelques paramètres du système antioxydant. ....	69

<b>Figure 36:</b> Effet des trois extraits d' <i>Helix aspersa</i> sur le nombre de leucocytes totaux .....	70
<b>Figure 37 :</b> Effet des extraits d' <i>Helix aspersa</i> sur le taux de leucocytes dans le BALF .....	71
<b>Figure 38 :</b> Effet des extraits d' <i>Helix aspersa</i> sur la concentration en protéines dans le BALF .....	72
<b>Figure 39 :</b> Effet des extraits d' <i>Helix aspersa</i> sur l'activité de la myéloperoxydase dans le BALF .....	73
<b>Figure 40 :</b> Effet des extraits d' <i>Helix aspersa</i> sur la masse des poumons.....	74
<b>Figure 41 :</b> Effets des extraits d' <i>Helix aspersa</i> sur l'histologie du poumon .....	76
<b>Figure 42:</b> Effet de l'extrait aqueux d' <i>Helix aspersa</i> sur la mort des lignées tumorales Hut-78 et SeAx après 24h d'incubation .....	78
<b>Figure 43:</b> Effet de l'extrait hydroalcoolique d' <i>Helix aspersa</i> sur la mort des lignées tumorales Hut-78 et SeAx après 24h d'incubation .....	78
<b>Figure 44:</b> Marquage nucléaire par le colorant Hoechst des cellules tumorales incubées avec l'extrait aqueux d' <i>Helix aspersa</i> .....	79
<b>Figure 45:</b> Effet anti-prolifératif des extraits hydroalcoolique et organique d' <i>Helix aspersa</i> sur des lignées normale et tumorales .....	80
<b>Figure 46:</b> Effet des extraits aqueux et hydroalcoolique sur la production de la MMP-9 par les lignées tumorales Hut-78 et SeAx .....	82
<b>Figure 47:</b> Mesure de l'absorbance des deux fractions C et F à $\lambda=280\text{nm}$ .....	84
<b>Figure 48:</b> Q-Sepharose FF de l'extrait « C ».....	85
<b>Figure 49:</b> Mesure de l'activité protéolytique des différentes fractions obtenues.....	87
<b>Figure 50:</b> Mesure de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteurs (substrat Z-Arg-Arg-AMC).....	88

<b>Figure 51:</b> Activité antiproliférative des extraits bruts C et F ainsi que de quelques fractions obtenues sur Q-Sépharose.....	90
<b>Figure 52:</b> Les différentes voies de signalisations dans les lymphocytes T .....	93
<b>Figure 53 :</b> Schéma résumant le mécanisme d'action de la cyclosporine A .....	94
<b>Figure 54:</b> Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression des MMPs .....	104
<b>Figure 55:</b> Voies de granzymes impliquées dans l'induction de la mort cellulaire.....	107
<b>Figure 56 :</b> Droite d'étalonnage réalisée avec la BSA.....	114
<b>Figure 57 :</b> Droite d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique.....	114
<b>Figure 58 :</b> Droite d'étalonnage du MDA.....	115
<b>Figure 59 :</b> Droite d'étalonnage réalisée avec le glutathion réduit.....	115

## **Liste des tableaux :**

<b>Tableau 1:</b> Composition biochimique du pied de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	9
<b>Tableau 2 :</b> Cellules de l'inflammation.....	10
<b>Tableau 3:</b> Les principaux médiateurs biochimiques dans la réponse inflammatoire.....	11
<b>Tableau 4 :</b> Liste des récepteurs de l'immunité innée et leur localisation.....	12
<b>Tableau 5 :</b> Les facteurs pro- et anti-angiogéniques.....	24
<b>Tableau 6 :</b> Quelques anticorps monoclonaux à usage thérapeutique en oncologie.....	35
<b>Tableau 7 :</b> Lignées cellulaires utilisées dans notre étude et leurs caractéristiques.....	52

## Liste des abréviations :

**AcM:** Anticorps Monoclonal

**ADN :** Acide désoxyribose Nucléique

**AINS :** anti-inflammatoire non stéroïdien

**ALAT :** Alanine Amino Transférase

**ang:** angiopoéline

**AP-1:** Activating Protein-1

**Arg:** arginine

**ASAT :** Aspartate aminotransférase

**Asp:** aspartic acid

**BALF :** Broncho-alveolar liquide fluid ou le liquide du lavage Bronchoalvéolaire.

**Bcl2 :** B Cell Lymphoma2

**Ca:** calcium

**CAM :** Complexe d'attaque Membranaire

**Caspases :** Cysteine-dependent aspartate-directed protease

**CD40L :** Cluster of Differentiation 40 Ligand

**CMH :** Complexe Majeur d'histocompatibilité

**COX:** cyclo-oxygénase

**CRP:** Protein C reactive

**CsA:** Cyclosporine A

**CTL:** Cutaneous T cell Lymphoma

**Cu:** cuivre

**CXCL10:** C-X-C motif chemokine 10

**DAMPs:** Damage Associated Molecular Pattern

**DC :** Dendritic cell

**DTNB:** 5'-Dithiobis 2-Nitrobenzoïque

**EDTA :** Ethylenediaminetetraacetic acid

**FBS:** Fetal Bovine serum

**Fe:** Fer

**FGF:** Fibroblaste Growth Factor

**FGF a:** FGF acide

**FGF b:** FGF basique

**GB :** Globules Blancs

**Gln:** glutamine

**GM-CSF :** Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor

**GR :** Globules rouges

**GSH :** Glutathion réduit

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

**HCl :** Acide chlorhydrique

**HMGB1:** High Mobility Group Box-1

**HOCl:** hypochlorite d'hydrogène

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography

**HSP:** Heat Shock Protein

**IFN:** Interferon

**IL :** Interleukine

**IMID:** Immune Mediated Inflammatory Diseases

**JAK/STAT:** Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription

**Kca:** Kilocalorie

**kDa:** kilodalton

**KGF:** Keratinocyte Growth factor

**LB :** Lymphocyte B

**LOX :** Lipooxygénase

**LT :** Lymphocyte T

**LTc :** Lymphocytes T cytotoxique

**LTh :** Lymphocyte T helper

**Lys:** Lysine

**MAPKinase:** Mitogen Associated Protein Kinases

**MDA :** Malondialdehyde

**MEC:** Matrice Extracellulaire

**Met:** Methionine

**Mg:** Magnésium

**MMP:** Métalloprotéinase Matricielle

**Mo :** Macrophage

**MPO :** myéloperoxydase

**NaCl :** Chlorure de Sodium

**NaOH :** Hydroxyde de sodium

**NFAT :** Nuclear Actor of Activating T cell Receptor

**NFκB :** Nuclear Factor-kappa B

**NFκB:** Nuclear Factor κ B cell

**NK :** Natural Killer

**NO:** monoxide d'azote

**P :** phosphore

**PAF:** Platelet Activating Factor

**PAMPs:** Pathogen Associated Molecular Pattern

**PBS:** Phosphate Buffer Saline

**PDGF:** Platelet Derived Growth Factor

**PDGFR:** Platelet Derived Growth Factor Receptor

**pH :** potentiel d'hydrogène

**Phe:** phenylalanine

**PLA2:** Phospholipase 2

**PM :** poids moléculaire

**PRR:** Pattern Recongnition Pathogen

**ROS :** Reactive Oxygene species

**RTK :** Récepteur à activité tyrosine kinase

**SDS :** Sodium Dodecyl Sulfate

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**SOD :** Superoxyde Dismutase

**TADC:** Tumor Associated Dendritic Cells

**TAM:** Tumor Associated Macrophages

**TBARS:** acide thiobarbiturique

**TCA:** Trichloroacetic acid

**TCR:** T cell Receptor

**TGFβ:** Transforming Growth Factor β

**TH2 :** T helper 2

**TIL:** Tumor Infiltrating Lymphocyte

**TMED:** NN'N'-tétraméthyléthylènediamine

**TNB:** Acide thionitrobenzoïque

**TNF :** Tumor Necrosis Factor

**Treg:** Lymphocyte T régulateur

**Trp:** tryptophane

**Tyr:** tyrosine

**UV:** Ultra violet

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth  
Factor

**VEGFR:** Vascular Endothelial Growth  
Factor Receptor

**Zn:** zinc

# I. Introduction

Il est maintenant admis que les biomolécules sont parmi les différents axes de recherche qui sont actuellement exploités et très dominants. La recherche sur les biomolécules vise à découvrir de nouvelles pistes pour le développement de médicaments pour différentes maladies notamment les cancers et les maladies inflammatoires. En effet, leur objectif est d'identifier des composés bioactifs et de comprendre leur mode d'action afin d'entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ainsi, les produits naturels offrent un grand espoir pour la santé publique.

Les biomolécules dérivent des sources naturelles comme les plantes, les microorganismes ou encore les animaux (insectes, invertébrés,...). Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent de ces êtres vivants pour isoler et fabriquer des produits pharmaceutiques.

Les mollusques sont connus pour leur richesse en principes actifs, permettant d'agir à plusieurs niveaux de l'organisme. Il existe des mollusques marins et autres terrestres. Ils contiennent des biomolécules qui sont utilisées dans les domaines de la cosmétique, la pharmacologie et la nutrition.

Les premiers travaux sur les mollusques marins remontent aux années 50. Ces dernières années, la recherche de produits naturels marins a explosé et beaucoup de nouveaux composés d'origine marine ont été isolés (**Blunt *et al.*, 2009**).

Parmi les mollusques terrestres exploités en pharmacologie on trouve les escargots. Ces gastéropodes ont déjà fait l'objet de criblages biologiques qui ont révélé de réelles propriétés thérapeutiques (**Ghosh *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003 ; Bonnemain, 2005 ; Kim *et al.*, 2007**).

*Helix aspersa* est une espèce d'escargot comestible facile à récolter et très répandue en Algérie. Elle a été depuis l'antiquité, utilisée en médecine et préparée sous différentes formes pharmaceutiques (pommade, sirop, etc.). En effet, plusieurs travaux ont constaté l'effet des substances issues de l'escargot sur la santé humaine : activité mucolytique *in vitro*, action inhibitrice sur les cultures de bacilles coquelucheux, une activité spasmolytique, un effet broncho-relaxant, etc. (**Bonnemain, 2003**).

La littérature rapporte peu de travaux sur les effets des extraits de mollusques ; sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inflammation, l'angiogénèse et le cancer.

L'inflammation est un processus complexe impliquant un réseau multifactoriel de signaux chimiques. La réponse inflammatoire peut évoluer vers la chronicité provoquant de sérieuses

pathologies caractérisées par une destruction tissulaire importante, pouvant mener au cancer et stimuler les mécanismes de l'angiogénèse. La production excessive de médiateurs pro-inflammatoires pourrait être la cause (**Mantovani et al., 2008**).

Les médicaments anti-inflammatoires ont pour cibles la cyclo-oxygénase (COX), des cytokines (le TNF  $\alpha$  et les interleukines IL-1 et IL-6) et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'usage de ces anti-inflammatoires se trouve confronté à de nombreux effets secondaires tels que les maladies gastro-intestinales, l'immunodépression, les maladies auto immunes... (**Helms, 2006 ; Rang & Dale, 2012**).

L'immunodépression favorise l'inhibition de la surveillance immunitaire normalement développée par l'organisme et laisse place au développement anarchique des cellules menant ainsi au cancer et l'échappement tumoral.

Le cancer figure parmi les principales causes de mortalité dans le monde. Selon les statistiques de l'organisation mondiale de la santé faites en 2013, le nombre de nouveaux cas a atteint 14,1 millions avec 8,2 millions de décès enregistrés en 2012 dans le monde (**Bray et al., 2013 ; Ferlay et al., 2013**) . En Algérie, selon la Société algérienne d'oncologie médicale (SAOM), durant ces dernières années, les cas de cancer ont augmenté de manière considérable passant de 80 cas pour 100.000 habitants en 1993 à 120 cas durant les années 2000. Cette maladie se manifeste lorsque le contrôle de la division normale de la cellule est rompu. De plus, la cellule tumorale acquiert lors des différents stades de son développement plusieurs mécanismes qui peuvent l'aider à croître et envahir d'autres tissus:

- ✚ La capacité de se multiplier spontanément sans recevoir de messages de division et même en présence de signaux inhibiteurs (**Hanahan and Weinberg, 2000**).
- ✚ La perte de la communication avec les cellules de son environnement.
- ✚ Leur résistance à l'apoptose suite à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (exemple :gène P53) et l'expression des gènes impliqués dans la prolifération anarchique (NF $\kappa$ B). (**Ghobrial et al., 2005**).
- ✚ Induction de l'angiogénèse et expression du gène VEGF.

L'angiogénèse est un processus physiologique. Elle peut être activée suite à production des différents facteurs pro-angiogéniques (VEGF, b FGF, PDGF, TNF $\alpha$ ...). Ce mécanisme est nécessaire au développement et à la croissance tumorale, permettant l'apport, la diffusion des

nutriments, l'élimination des déchets, l'invasion tumorale des autres tissus ainsi que les métastases (Arras *et al.*, 1998; Couffinhal *et al.*, 1999).

Ce processus peut être facilité par l'expression des protéases appelées *Métalloprotéinases Matricielles* « MMP » notamment la MMP-9. Cette protéase permet la dégradation de la lame basale du tissu accueillant la tumeur, et l'induction de l'angiogénèse tumorale nécessaire à la libération des facteurs pro-angiogéniques (Antonicelli *et al.*, 2012).

Il existe plusieurs moyens pour confronter ces maladies cancéreuses : la radiothérapie, la chimiothérapie, etc. Malheureusement, ces différentes thérapies ont également des effets toxiques sur les cellules saines.

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des processus et des mécanismes de défense mis en œuvre par un organisme pour lutter contre l'attaque d'éléments étrangers ou contre des éléments endogènes modifiés, tout en assurant une immuno-surveillance adéquate. Cependant, il joue également un rôle dans la majorité des pathologies telles que les cancers. Ces maladies sont le résultat d'un défaut dans la surveillance et le contrôle immunitaire de la prolifération des cellules.

C'est pour cette raison que nous avons tenté de chercher de nouvelles molécules thérapeutiques qui permettraient de moduler les différentes actions du système immunitaire en étudiant les effets anti-inflammatoire, anti-tumoral et anti-angiogénique d'extraits du mollusque terrestre *Helix aspersa*.

Dans une première partie, nous avons préparé trois extraits : un extrait aqueux, un hydroalcoolique, et un organique à partir du pied (la chair) de l'escargot *Helix aspersa*. Ensuite, nous avons essayé de mettre en évidence la présence de biomolécules actives dans les différents extraits.

D'autre part, nous avons évalué l'effet antioxydant *in vivo* de l'homogénat du pied d'escargot chez le rat, ayant reçu un médicament immunosuppresseur (Cyclosporine A) connu par son hépatotoxicité.

Ensuite, nous avons évalué l'effet anti-inflammatoire *in vivo* des trois extraits sur un modèle d'inflammation aiguë pulmonaire chez le rat, en comparant leurs effets à un médicament anti-inflammatoire.

L'effet anti tumoral de nos extraits a été testé sur une lignée cellulaire normale de rein de singe (MK2) et tumorales liquides (lymphome cutané : HUT-78, SeAx et de leucémie myéloïde chronique : K562) et matricielles (carcinome pulmonaire : A549 et carcinome hépatocytaire : HUH7).

Nous avons étudié le mode d'action de l'extrait aqueux sur la lignée HUT-78 en évaluant la condensation et la fragmentation de la chromatine par la coloration Hoechst.

L'effet anti-angiogénique a été apprécié *in vitro* par quantification de l'expression d'une protéase impliquée dans l'angiogénèse et l'invasion tumorale (la métalloprotéase MMP-9), dans deux lignées de lymphome cutané (HUT-78 et SeAx), stimulées par les extraits aqueux et hydroalcoolique.

La dernière étape consiste à fractionner l'extrait protéique préparé à partir du pied du gastéropode *Helix aspersa* par chromatographie échangeuse d'anions et les fractions obtenues ont été testées pour leur activité protéolytique contre des substrats de synthèse ainsi que leur activité antiproliférative par le test MTT contre les lignées cellulaires normale (MK2) et tumorales (K562, A549 et HUH7).

**II- Revue**

**Bibliographique**

# Chapitre 1

*Helix aspersa*

### 1- Présentation et classification de l'espèce *Helix aspersa*

Il existe en Algérie un très grand nombre d'escargots dont la taille varie de quelques millimètres à quelques centimètres et dont les plus communs correspondent à *Helix aspersa* (petit gris), à *Helix pomatia* (l'escargot de Bourgogne). Dans la présente étude, nous nous intéressons qu'à l'espèce *Helix aspersa* (**figure 1**). Elle appartient à l'embranchement des mollusques, la classe des gastéropodes et la famille des Hélicidés (**Bonnet et al., 1990**) :

<b>Règne:</b>	Animalia
<b>Embranchement :</b>	Mollusca
<b>Classe :</b>	Gastéropoda
<b>Sous -classe :</b>	Pulmonés
<b>Ordre :</b>	Stylomatophora
<b>Super-famille :</b>	Helicacea
<b>Famille:</b>	Helicidae
<b>Genre :</b>	<i>Helix</i>
<b>Espèce :</b>	<i>aspersa</i>
<b>Sous-espèce :</b>	<i>aspersa</i>



**Figure 1:** L'escargot *Helix aspersa* (**Douafer, 2010**)

### 2- Morphologie de l'escargot *Helix aspersa*

#### 2-1- La coquille

C'est un animal dont le corps est dépourvu de squelette et avec un aspect mou. Il possède une coquille enroulée dans le sens des aiguilles d'une montre et secrétée par le manteau. Elle contient tout son corps (le pied et la masse viscérale), (**figure 2**). Elle est composée de protéines (2 %) et de minéraux (calcite et aragonite) (**Chase, 1986 ; Pirame, 2003**).

## 2-2- Le pied

L'animal en extension fait apparaître un muscle appelé le pied. Il aide l'animale à se déplacer. Le pied comprend une tête sur laquelle se trouvent deux paires de tentacules :

- ✓ Tentacules tactiles : antérieures, de petite taille.
- ✓ Tentacules oculaires : postérieurs, de grande taille.

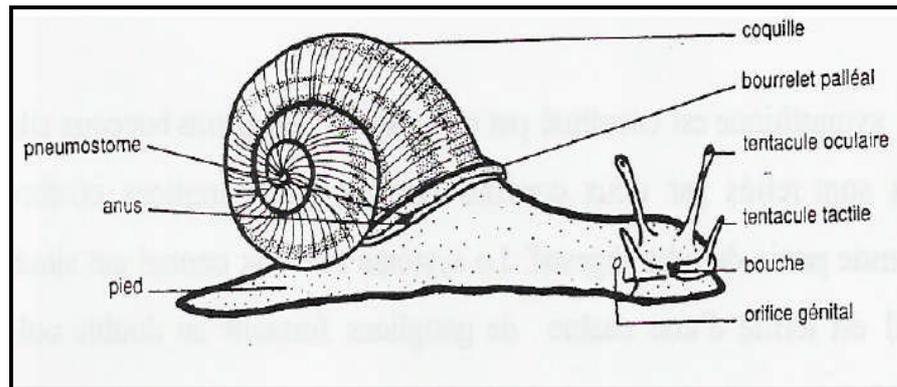


Figure 2 : Morphologie de l'*Helix aspersa* (Bonnet *et al.*, 1990)

## 3- Anatomie de l'escargot *Helix aspersa*

L'anatomie de l'escargot *Helix aspersa* est représentée dans la figure 3, elle comprend l'ensemble des organes et des systèmes.

### 3-1- Le système digestif

La bouche se prolonge par ce qu'on appelle le bulbe buccal en formant l'œsophage. Ce dernier se termine par l'estomac. L'estomac se prolonge à son tour et forme l'intestin (Pirame, 2003).

### 3-2- Le système nerveux

Le système nerveux d'*Helix aspersa* est constitué de deux systèmes (Pirame, 2003).

- a- Un Système nerveux sympathique : constitué d'une paire de ganglions buccaux qui se trouve sous le bulbe buccal et une paire de ganglions cérébroïdes qui sont reliés entre eux par deux cordons nerveux.
- b- Un Système nerveux central : il se localise dans la région céphalique est constitué d'une chaîne de ganglions.

### 3-3- *Le système circulatoire*

Son système circulatoire est constitué :

- **D'un cœur** : constitué d'une seule oreillette et un ventricule (**Pirame, 2003**).
- **De l'hémolymphe** : c'est le liquide physiologique d'*Helix aspersa* ainsi que d'autres mollusques terrestres et marins. L'hémolymphe circule dans un système veineux et un autre artériel. Il est propulsé dans le réseau artériel via deux aortes. Il contient un pigment appelé l'hémocyanine et des cellules appelées " hémocytes" (**Van Holde & Miller, 1995 ; Sanchez et al., 1998 ; Adamowicz & Bolaczek 2003**).
- **L'hémocyanine** : c'est une molécule de nature protéique de la famille des métalloprotéines dont le rôle est de transporter l'oxygène (**Markl, 2013**).

### 3-4- *L'appareil reproducteur* :

Il faut rappeler que l'escargot est un animal hermaphrodite ; son appareil génital est formé de (**Pirame, 2003**):

- une gonade (ovotestis) : un lieu de formation des cellules sexuelles mâles et femelles (ovule et spermatozoïde) ;
- un canal hermaphrodite : dont le rôle est l'évacuation des gamètes ;
- l'albumine : une glande blanchâtre dont le rôle est l'élaboration des réserves vitelline ;
- un ovospermiducte (Pirame, 2003)

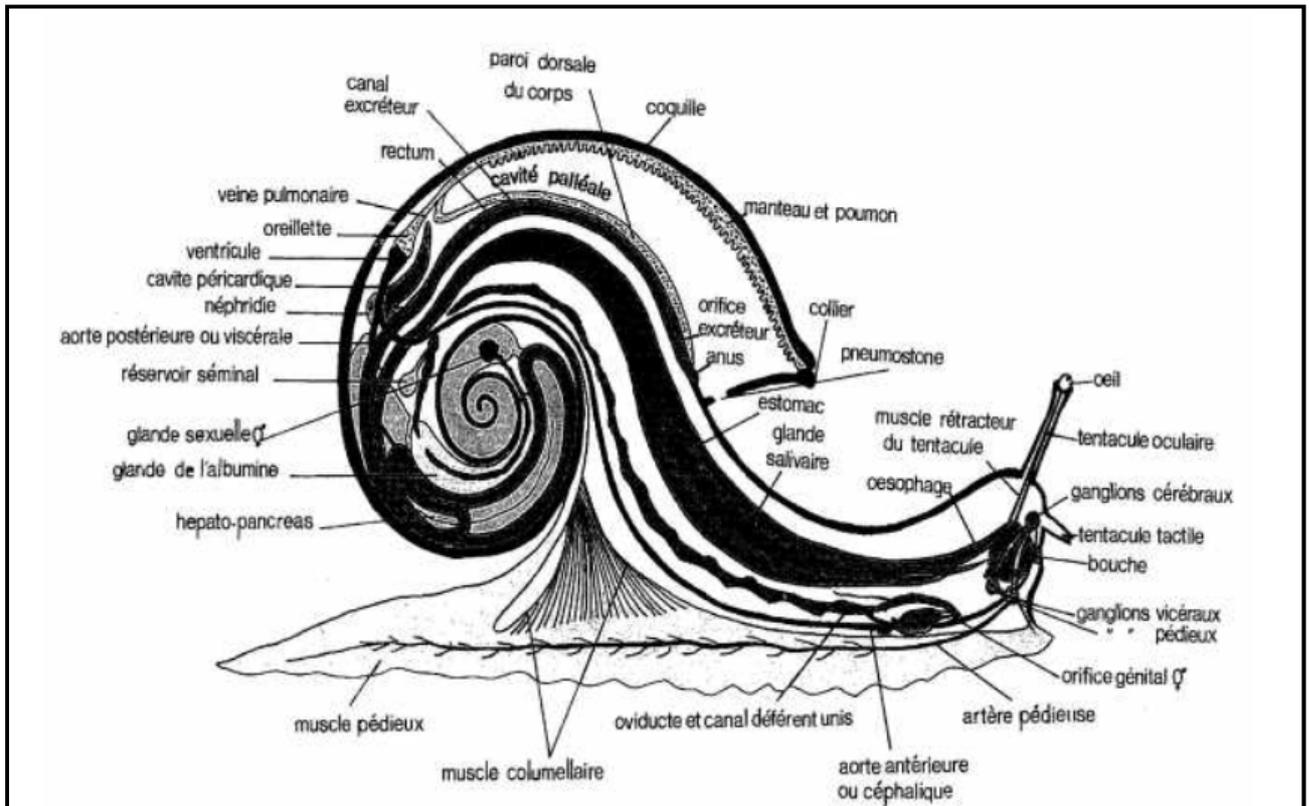


Figure 3 : Anatomie de l'escargot *Helix aspersa* (Pirame,2003)

#### 4- Les différents types de glandes d'*Helix aspersa* sécrétant le mucus

Les glandes sécrétant le mucus sont localisées sur le bord du manteau et sur le pied d'*Helix aspersa*. Ces glandes sont unicellulaires (chaque cellule glandulaire a été nommée une glande). Elles sécrètent le mucus à travers les pores entre les cellules épidermiques. Au moins huit différents types de glandes ont été mis en évidence dont quatre sécrètent différents types de mucus (Campion, 1960) :

- un mucus protéique,
- un mucus contenant des granules de carbonate de calcium,
- une sécrétion de pigments contenant les flavonoïdes.

**5- Composition biochimique et qualité nutritionnelle de l'escargot *Helix aspersa***

Des études réalisées sur la chair de l'escargot *Helix aspersa* ont démontré sa qualité nutritionnelle. En effet, la chair contient une forte concentration en protéine et une faible teneur en lipide (**Tableau 1**). Ces derniers sont représentés par des acides gras très bénéfiques qui sont l'acide linoléique et l'acide linoléique. (**Gomot, 1998 ; Taoder, 2009**). La faible quantité de lipides dans la chair de cet escargot fait de lui un aliment peu calorique (67 Kcal/100g). Ainsi, il est moins calorique que la viande maigre et le poisson (**Taoder, 2009**) ; ce qui le classe parmi les aliments alternatifs sains. En outre, les escargots accumulent des quantités importantes de calcium dans leur muscle (pied). En effet, ils accumulent dix fois plus que la viande rouge et blanche, et sont très riches en ions cuivre, en fer et zinc (**Tableau 1**).

D'autres études ont montré l'accumulation d'un autre élément très important pour le bon fonctionnement l'organisme humain : le sélénium reconnu par son activité anti-oxydante (**Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008 ; Taoder, 2009**).

**Tableau 1:** Composition biochimique du pied de l'escargot *Helix aspersa* (**Gomot, 1998**).

<b>Matière organique</b>	
<b>Eau (%)</b>	<b>87.5</b>
<b>Protéines (g/100g)</b>	<b>8.1</b>
<b>Lipides (g/100g)</b>	<b>0.8</b>
<b>Glucides (g/100g)</b>	<b>6.5</b>
<b>Minéraux</b>	
<b>Ca (mg/100g)</b>	<b>200</b>
<b>P (mg/100g)</b>	<b>73</b>
<b>Mg (mg/100g)</b>	<b>52.7</b>
<b>Fe (mg/Kg)</b>	<b>10</b>
<b>Cu (mg/Kg)</b>	<b>31</b>
<b>Zn (mg/Kg)</b>	<b>10</b>

# Chapitre 2

# L'inflammation

### 1- Définition de la réaction inflammatoire et ses principaux effecteurs

L'inflammation est une réaction de défense naturelle déclenchée lorsque le corps est menacé par des agents pathogènes, des cellules endommagées ou des irritants. Cette réponse est essentielle pour l'être humain afin de combattre les différentes infections, pour favoriser la cicatrisation et le rétablissement de la fonction normale du tissu endommagé. Elle est caractérisée par 4 signes : une rougeur, un gonflement avec chaleur et douleur (**Russo-Marie et al., 1998**) et met en jeu un grand nombre de cellules (**tableau 2**) et de nombreux médiateurs biochimiques (**tableau 3**).

**Tableau 2** : Cellules de l'inflammation (**Hellal, 2007**).

Cellules sanguines circulantes	Cellules résidentes tissulaires
Neutrophiles	Macrophages
Monocytes	Mastocytes
Eosinophiles	Cellules endothéliales
Basophiles	Fibroblastes
Plaquettes	
Lymphocytes	
Plasmocytes	

Quel que soit le facteur inducteur, la réponse inflammatoire sera la même mais avec des intensités et des durées variables. La réponse inflammatoire peut être éphémère ; se manifeste immédiatement après l'invasion de l'agent pathogène et dure jusqu'à 48 h environ. Dans ce cas elle est appelée inflammation aiguë. Toutefois, elle peut persister des années d'où on l'appelle l'inflammation chronique.

**Tableau 3 (synthèse) : Les principaux médiateurs biochimiques dans la réponse inflammatoire.**

( Hosford *et al.*, 1990 ; Henrotin *et al.*, 1992 ; St Clair, 1998 ; Deby-Dupont *et al.*, 1995 ; Murell *et al.*, 1996 ; Stichtenoth & Frolic, 1998; Morita *et al.*, 1999 ; Bonizzi *et al.*, 2000 ; Serteyn *et al.*, 2003 ; Kindt *et al.*, 2007)

Médiateurs de l'inflammation	Membres	Source	Caractéristiques	Effets
<b>Protéines sériques</b>	La protéine c réactive « CRP »	- sécrétée par le foie au moment de la phase aigüe de l'inflammation.	- reconnaître et se lier au motif, <b>c polysaccharide cell wall</b> retrouvé sur la surface de certaines bactéries et champignons.	- active le système du <b>complément</b> ⇒ entraîne l'élimination du pathogène par sa lyse ou par la phagocytose
<b>Amines vasoactives</b>	Histamine	- produites lors de la dégranulation des mastocytes.	- se lie à des récepteurs retrouvés au niveau des capillaires et des veines.	- entraînant une vasodilatation et une augmentation de leur perméabilité
<b>Médiateurs lipidiques</b>	Leucotriènes Prostanoides  Platelet Activating Factor (PAF)		- produits par deux voies (voie COX1 et COX2 et la voie lipo-oxygénase) à partir de l'acide arachidonique	- propriétés chimiotactiques pour les éosinophiles et les neutrophiles - stimulent également la sécrétion de certaines cytokines : IL-2 et IFN $\gamma$  - L'augmentation de la perméabilité vasculaire. - La stimulation de l'agrégation plaquettaire. - L'activation des leucocytes.
<b>Dérivés d'oxygène et d'azote</b>	NO	les éosinophiles, les neutrophiles et les macrophages	- une courte durée de demi-vie < à 50 sec	- contribuent à l'apoptose, et à la protéolyse de la MEC . - impliqués dans la cascade de l'activation du NF $\kappa$ B par l'IL-1 $\beta$ en tant que second messenger. - jouent deux rôles dans le processus inflammatoire : un rôle pro-inflammatoire et un rôle anti-inflammatoire.
<b>Enzymes</b>		Neutrophiles	-enzyme hémiq présente dans les granules des neutrophiles	-activité peroxydase
<b>Cytokines</b>	-IL-1, IL-6 -TNF $\alpha$ -IFN $\alpha$	- produites par de très nombreux types cellulaires.	- molécules solubles. - nature glycoprotéique. - faible PM. - Leur action se fait par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.	- permettent le dialogue entre les cellules. - régulent la prolifération, l'activation la différenciation, la survie et la mort cellulaire.

## 1-1- L'inflammation aiguë

Elle est décrite selon quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (**Barton, 2008**).

### 1-1-1- La reconnaissance des signaux de danger

Elle nécessite une interaction entre une molécule localisée sur les cellules immunitaires et une autre présente sur le pathogène. En 1989, Janeway a suggéré l'existence d'une classe de récepteurs spécifiques à l'immunité innée ; appelés PRR ou Pattern Recognition Pathogen, (**tableau 4**). Ils sont nombreux et sont capables de reconnaître des motifs moléculaires à la surface des microbes et de les fixer. Ces structures microbiennes sont connues sous le nom de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Ils sont conservés chez de nombreux pathogènes (**Medzhitov & Janeway, 1997 ; Medzhitov, 2001**).

En plus des PAMPs, il existe une autre classe de molécules reconnues par les PRRs et dont l'origine diffère de celle des PAMPs. En effet, il s'agit d'un groupe de molécules appelées DAMPs (Damage-associated molecular Pattern) ou *alarmines* (**Oppenheim et al., 2007**). Ces inducteurs endogènes (contrairement aux PAMPs qui sont exogènes) regroupent tous les signaux produits par un tissu lésé, par les cellules nécrosées ou par des cellules immunitaires. Ils permettent le recrutement des cellules immunitaires exprimant les PRR, notamment des cellules dendritiques, favorisant ainsi la réponse immunitaire adaptative. (**Bianchi, 2007**). On y trouve : le HMGB1 « High mobility group box 1 » (un facteur de transcription qui lie les nucléosomes permettant le repliement de l'ADN), les protéines de la famille S100, les protéines de choc thermique (HSP : Heat shock protein) (**Agresti & Bianchi 2003 ; D'Ambrosio et al., 2003 ; Bianchi, 2007; Klune et al., 2008 ; Tsan & Gao, 2009**).

**Tableau 4:** Liste des récepteurs de l'immunité innée et leur localisation (**Millet, 2014**)

PRR	LOCALISATION
TLR (Toll like Receptor)	Transmembranaire ou endosomale
RIG (Rig Like Receptor)	Intracellulaire
NLR (Nod Like Receptor)	Cytoplasmique
CLR (C-type Lectin Receptor) RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products)	Transmembranaire

### 1-1-2- La formation du foyer inflammatoire

Elle implique une succession d'évènements qui aboutissent au recrutement des cellules inflammatoires dans le tissu lésé (Kindt *et al.*, 2007), (figure 4):

- Une vasodilatation entraînant l'élévation de la perméabilité vasculaire, ce qui facilite l'afflux des cellules dans le foyer inflammatoire.
- La diapédèse des cellules phagocytaires suite à l'adhérence des cellules à la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins et leur passage entre les cellules endothéliales vers le tissu (l'extravasation).
- La migration à travers le tissu vers le site de l'invasion. Les cellules phagocytaires s'accumulent et commencent alors à phagocyter l'agent pathogène. Elles libèrent dans le foyer inflammatoire des enzymes lytiques, ce qui peut endommager les cellules voisines. L'accumulation de cellules mortes ainsi que le matériel qui résulte de la digestion forme ce qu'on appelle **l'exudat**.

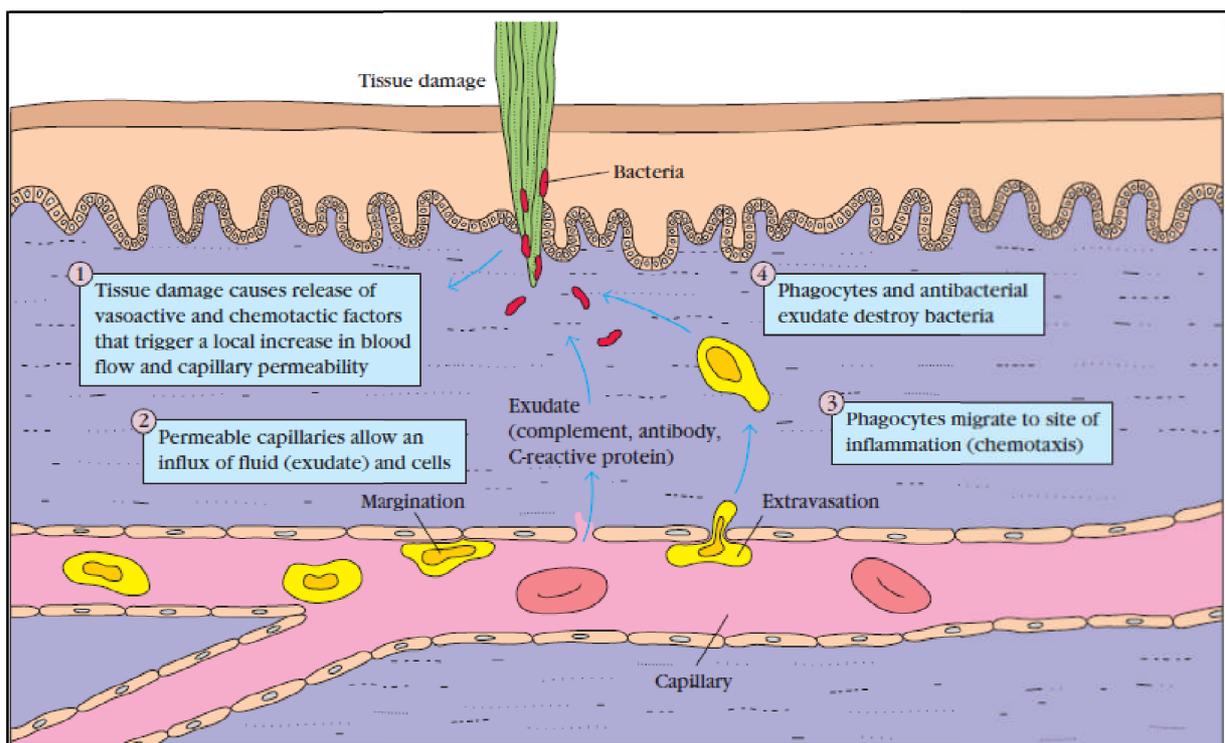
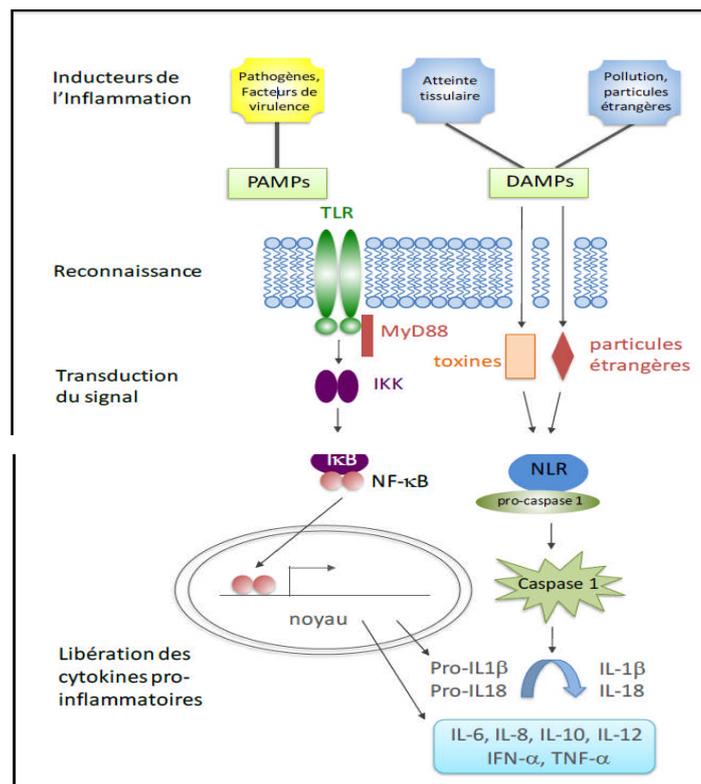


Figure 4 : Etapes de la formation du foyer inflammatoire (Kindt *et al.*, 2007)

### 1-1-3- Biosignalisation et réaction inflammatoire

Les effets des différents facteurs inflammatoires sont transmis par le biais de récepteurs membranaires exprimés par les cellules cibles. La liaison de ces molécules à leurs récepteurs appropriés active une cascade de phosphorylation des différentes molécules intracellulaires via deux voies : la voie des MAP kinases (Mitogen Associated Protein kinases) et la voie de JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription). La réponse cellulaire dépend de la voie de transduction du signal activée (**figure 5**). L'activation par phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription par des kinases: NFκB (Nuclar Factor κ B) et AP-1 (Activatory Protein-1), conduit à la transcription des gènes codants pour différentes protéines pro- ou anti-inflammatoires telles que : TGFβ, IL-1β, TNFα, chimiokines, molécules d'adhésion, MMPs... (Baeuerle, 1998 ; Herlaar *et al.*, 1999; McKay & Cidlowski, 1999). Il faut souligner que plusieurs médiateurs peuvent activer la même voie et plusieurs voies peuvent être activées par le même médiateur.



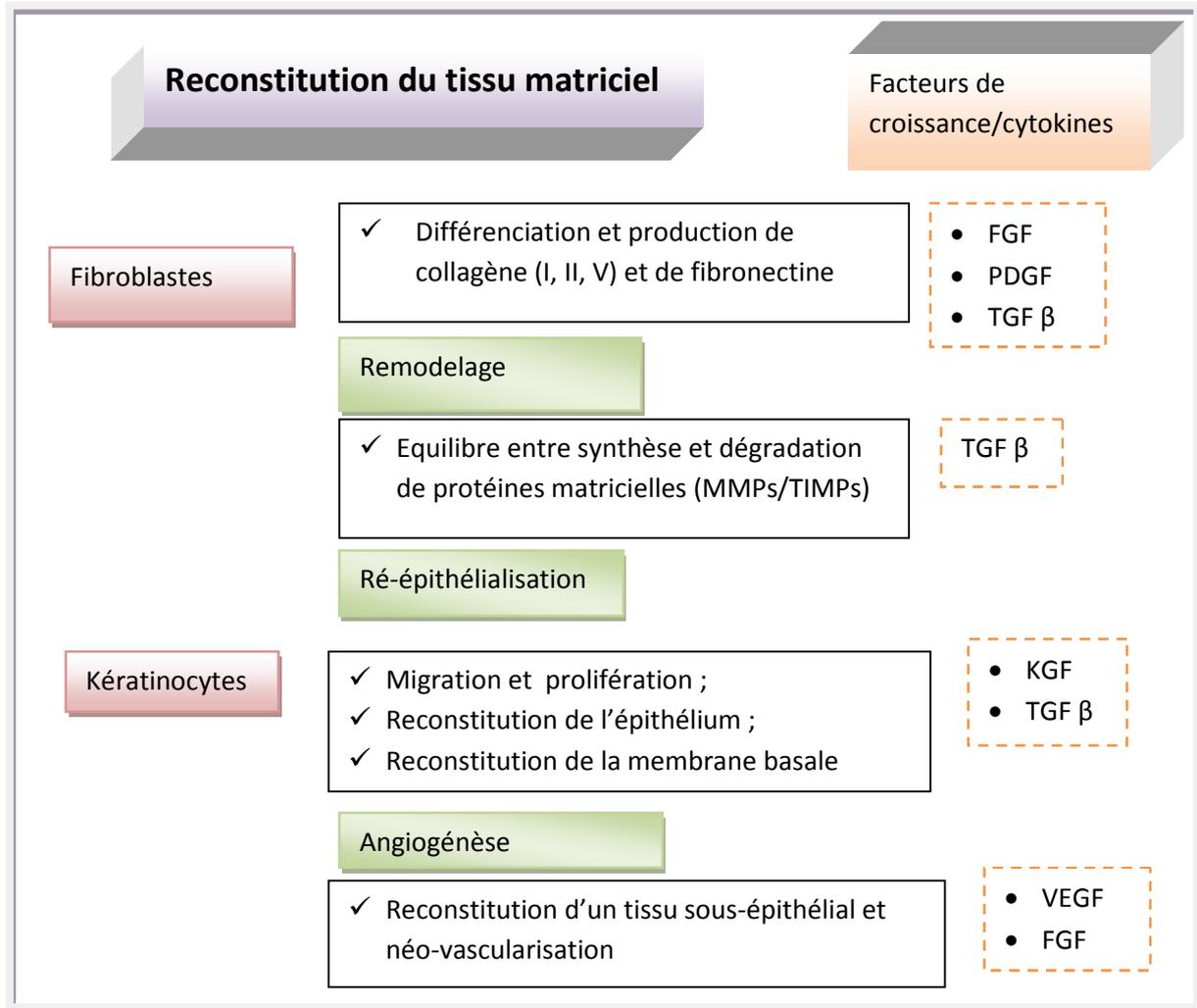
**Figure 5:** Représentation schématique de transduction du signal via le TLR (Mak & Saunders, 2004)

#### **1-1-4- Résolution de l'inflammation**

La réaction inflammatoire est complexe et implique une multitude de médiateurs biochimiques dont certains sont pro-inflammatoires et d'autres sont anti-inflammatoires. Le retour à l'homéostasie signifie l'élimination du pathogène et les produits de la dégradation tissulaire. Cela peut être atteint grâce à :

- la libération des cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) par les macrophages et les lymphocytes T reg (régulateurs) ainsi que des facteurs de croissance qui ont pour but la réparation du tissu dégradé (**Ortega-Gomez *et al.*, 2013**),
- la prolifération des fibroblastes et la synthèse du collagène et des protéoglycanes (**Hellal, 2007**).

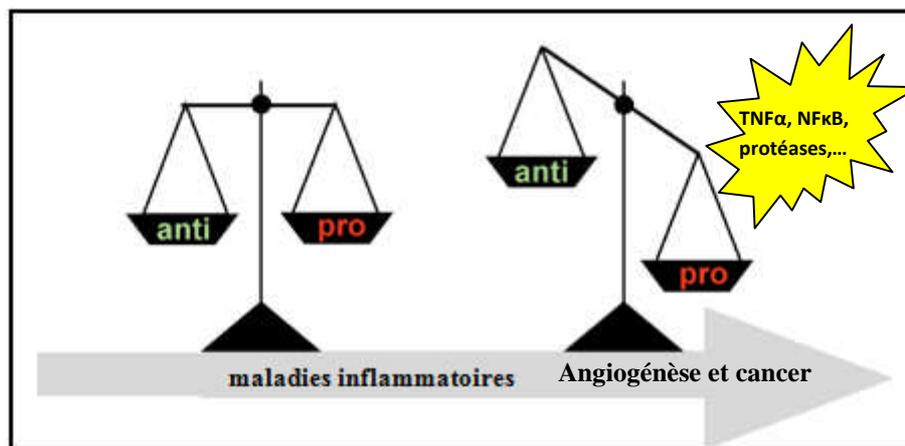
La balance entre les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, et TNF $\alpha$ ) et anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13 et TGF $\beta$ ) est la clé de la régulation de l'inflammation et dirige l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire (**Desreumaux, 1999 ; Dinarello, 2000**). En effet, l'installation d'un déséquilibre entre ces deux groupes de médiateurs conduit à la chronicité de la réaction inflammatoire et à la destruction des tissus enflammés. L'ensemble des mécanismes permettant la résolution et le retour à l'homéostasie sont résumés dans la **figure 6**.



**Figure 6 :** Principaux acteurs de la phase de réparation tissulaire (Hellal, 2007)

## 1-2- L'inflammation chronique

Quand l'agent pathogène persiste à cause de l'échec de la réponse inflammatoire aigüe ou d'une réponse inappropriée, la balance entre les molécules pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est perturbée et la réponse inflammatoire évolue vers la chronicité provoquant de sérieuses séquelles anatomiques et fonctionnelles. Ce déséquilibre est à l'origine de nombreuses pathologies caractérisées par une destruction tissulaire importante (**figure 7**) (**Hellal, 2007**).

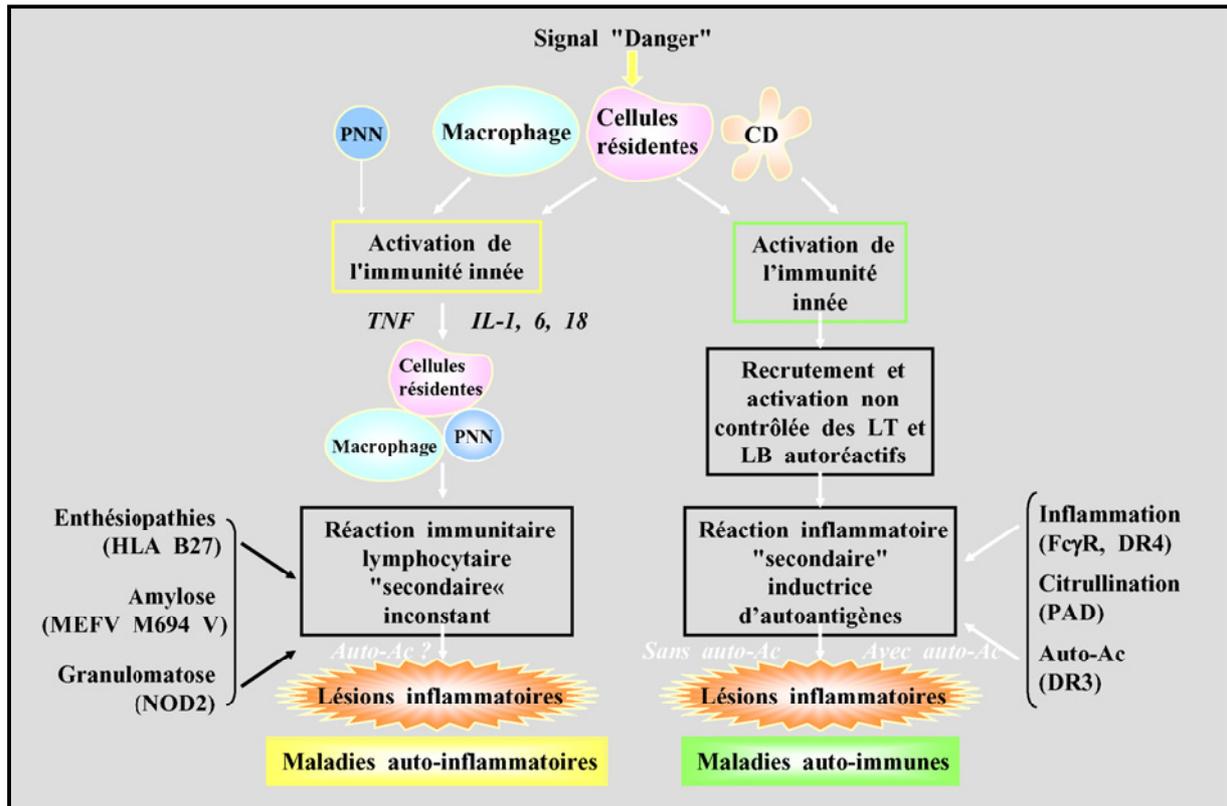


**Figure 7:** Balance entre les médiateurs pro- et anti-inflammatoires.

## 2- Maladies inflammatoires

On distingue des maladies inflammatoires et des maladies auto-immunes ; elles sont regroupées sous le terme : IMID (Immune Mediated Inflammatory Diseases) (**Figure 8**) et sont liées à des mécanismes spécifiques. Cette classification permet une adaptation des stratégies thérapeutiques en utilisant des molécules ciblées pour chaque forme de maladie (**Sibilia, 2007**).

Parmi les maladies inflammatoires les plus répandues dans le monde, on trouve la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, l'asthme, le psoriasis, la sclérose en plaques et les maladies inflammatoires de l'intestin (**Gautam & Jachak, 2009 ; Rang & Dale, 2012**).



**Figure 8 :** Schéma de Synthèse de la pathogénie des maladies inflammatoires (Sibilia, 2007)

### 3- Thérapies anti-inflammatoires et mode d'action des molécules thérapeutiques

Il est maintenant connu que l'inflammation est un processus complexe impliquant un réseau multifactoriel de signaux chimiques et que la production excessive de médiateurs pro-inflammatoires est impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires. Par conséquent, l'inhibition de la surproduction de ces médiateurs est une cible cruciale dans le traitement de ces affections (Helms, 2006 ; Gautam & Jachak, 2009 ; Rang & Dale, 2012 ).

Les cibles des différentes thérapies anti-inflammatoires comprennent la cyclo-oxygénase COX1 et 2, les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et les interleukines (IL-1 $\beta$  et IL-6). Le TNF- $\alpha$  et les interleukines sont connus pour leur rôle central dans la pathogénèse de nombreuses maladies inflammatoires, en particulier l'asthme et l'arthrite rhumatoïde. Ce sont des protéines impliquées dans les signaux intercellulaires de cellules immunitaires. Ces protéines présentent de nombreuses fonctions dans la promotion et la résolution de l'inflammation. Le facteur de transcription NF-kB est un régulateur principal de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'activation de l'inflammation. Il a été décrit comme ayant

un rôle majeur dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin ainsi que des maladies rhumatismales (**Helms, 2006 ; Gautam & Jachak, 2009 ; Rang & Dale, 2012**).

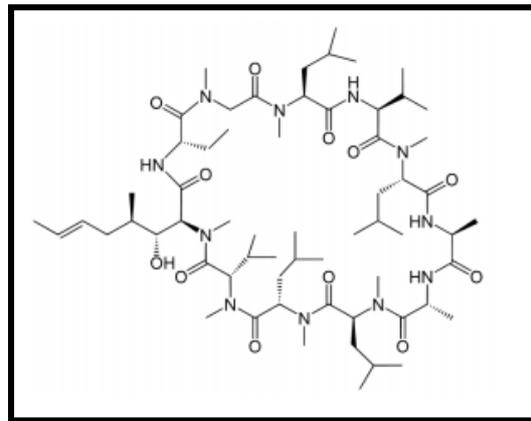
Les deux principaux groupes de médicaments utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires sont les corticostéroïdes, les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ces médicaments sont largement utilisés et sont efficaces dans le traitement de nombreuses maladies inflammatoires. Les corticostéroïdes jouent également un rôle majeur dans la thérapie de transplantation d'organe en raison de leurs effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. Malheureusement, ils sont également associés à de nombreux effets secondaires graves. Les corticostéroïdes sont bien connus pour provoquer l'hyperglycémie, une sensibilité accrue aux infections, des troubles psychiatriques, etc. Par ailleurs, l'utilisation à long terme des AINS provoque des maladies gastro-intestinales et le dysfonctionnement plaquettaire (**Helms, 2006 ; Rang et Dale, 2012**).

- *Anti-inflammatoires naturels*

Il existe plusieurs composés anti-inflammatoires naturels qui ont pour cibles particulières la COX-1 et -2, les lipoxygénases (LOX), le NO, la phospholipase A2 (PLA2), etc. Ces médiateurs pro-inflammatoires ont également été considérés comme des cibles potentielles dans la découverte de médicaments anti-inflammatoires. On trouve parmi les molécules anti-inflammatoires d'origine naturelle, la cyclosporine A. C'est un composé naturel (polypeptide cyclique), qui a été développé avec succès en tant qu'un immunosuppresseur de première ligne dans le traitement du rejet de greffes (**figure 9**), (**Chin et al., 2006**). Ce composé isolé, du champignon *Tolypocladium inflatum*, a été découvert par hasard en 1972. Utilisé pour la première fois en 1983, ce médicament a de nombreuses actions liées à l'activité immunosuppressive, mais le principal effet est l'inhibition sélective de l'IL-2 (**Rang et al., 2012 ; Tedesco & Haragsim, 2012**).

Au cours de ces dernières années, on a pu identifier de nombreux composés pharmacologiquement actifs avec une activité anti-inflammatoire, isolés à partir d'organismes marins (des éponges, des mollusques, des algues, des échinodermes et des bactéries) (**Gautam & Jachak, 2009 ; Folmer et al., 2010 ; Mayer et al., 2011 ; D'Orazio et al., 2012**). En effet, plusieurs organismes marins, en particulier les éponges et les escargots, ont pour effet l'inhibition de l'activité enzymatique de la PLA2 (**Gautam & Jachak, 2009 ; Folmer et al., 2010**). Bien que ces composés actifs ne soient pas encore des médicaments, ils ont montré une

activité anti-inflammatoire par divers mécanismes moléculaires, et représentent des candidats potentiels pour le développement de médicaments anti-inflammatoires.



**Figure 9** : Structure de la cyclosporine A (Chin *et al.*, 2006).

#### 4- Inflammation et cancer

Comme il a été mentionné précédemment, le dérèglement de la réponse inflammatoire joue un rôle central dans une multitude de maladies chroniques dont le cancer. Le mécanisme moléculaire par lequel l'inflammation chronique conduit vers le cancer comprend : l'augmentation de la production des médiateurs pro-inflammatoires (les cytokines), les chimiokines, La COX2, les MMPs, le NFκB, le STAT3, l'AP-1, l'activation des oncogènes, etc. (Sethi *et al.*, 2012).

Les chercheurs ont mis en évidence l'existence d'un lien entre l'inflammation et le cancer en se basant sur des observations des échantillons de biopsie de tumeurs ainsi que sur des études épidémiologiques. En effet, la plupart des tumeurs sont accompagnées de cellules inflammatoires (des macrophages « Tumor Associated Macrophages; TAM », de cellules dendritiques « Tumor-associated Dendritic cells ; TADC », et de lymphocytes « Tumor-infiltrating lymphocytes ; TIL»). Cette observation a été décrite pour la première fois en 1863 par **Rudolf Virchow**. De plus, les cancers apparaissent souvent dans le site de l'inflammation chronique (Mantovani *et al.*, 2008).

Le cancer dont l'origine est inflammatoire, est aussi caractérisé par la surproduction des médiateurs de l'inflammation dans le tissu néoplasique tels que les chimiokines, les cytokines, les prostaglandines. Le remodelage tissulaire et l'angiogénèse sont aussi similaires à ceux

observés dans l'inflammation chronique. En outre, le traitement par les AINS diminue le risque des cancers (**Mantovani et al., 2008**). En effet, les anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'aspirine, et l'ibuprofène semble être impliqués dans la prévention des cancers (tel que le cancer colorectal) (**Baron & Sandler, 2000**).

La liaison entre l'inflammation et le cancer a lieu selon de deux voies. Une voie intrinsèque dirigée par les conditions inflammatoires qui multiplie le risque des cancers. Elle est stimulée par l'activation des différents oncogènes (RAS, MYC,...) suite à des mutations, par le réarrangement chromosomiques et par l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces cellules transformées, produisent des médiateurs inflammatoires générant ainsi un microenvironnement inflammatoire au sein la tumeur. La deuxième voie, qui est extrinsèque, est dirigée par les altérations qui conduisent à l'inflammation et la néoplasie (**figure 10**). Les deux voies convergent et entraînent l'activation des facteurs de transcription, principalement le NFκB et STAT3, dans les cellules tumorales. L'activation de ces facteurs conduit à la production des différents médiateurs inflammatoires y compris : les cytokines, les chimiokines et COX2 qui induisent la production de la prostaglandine. Ces molécules activent et recrutent les différentes sous populations immunitaires. Les cytokines activent la production des mêmes facteurs dans les cellules inflammatoires, les cellules du stroma et les cellules tumorales, entraînant l'augmentation de la concentration des médiateurs inflammatoires, ce qui génère un microenvironnement inflammatoire qui est « lié au cancer » (**Mantovani et al., 2008**).

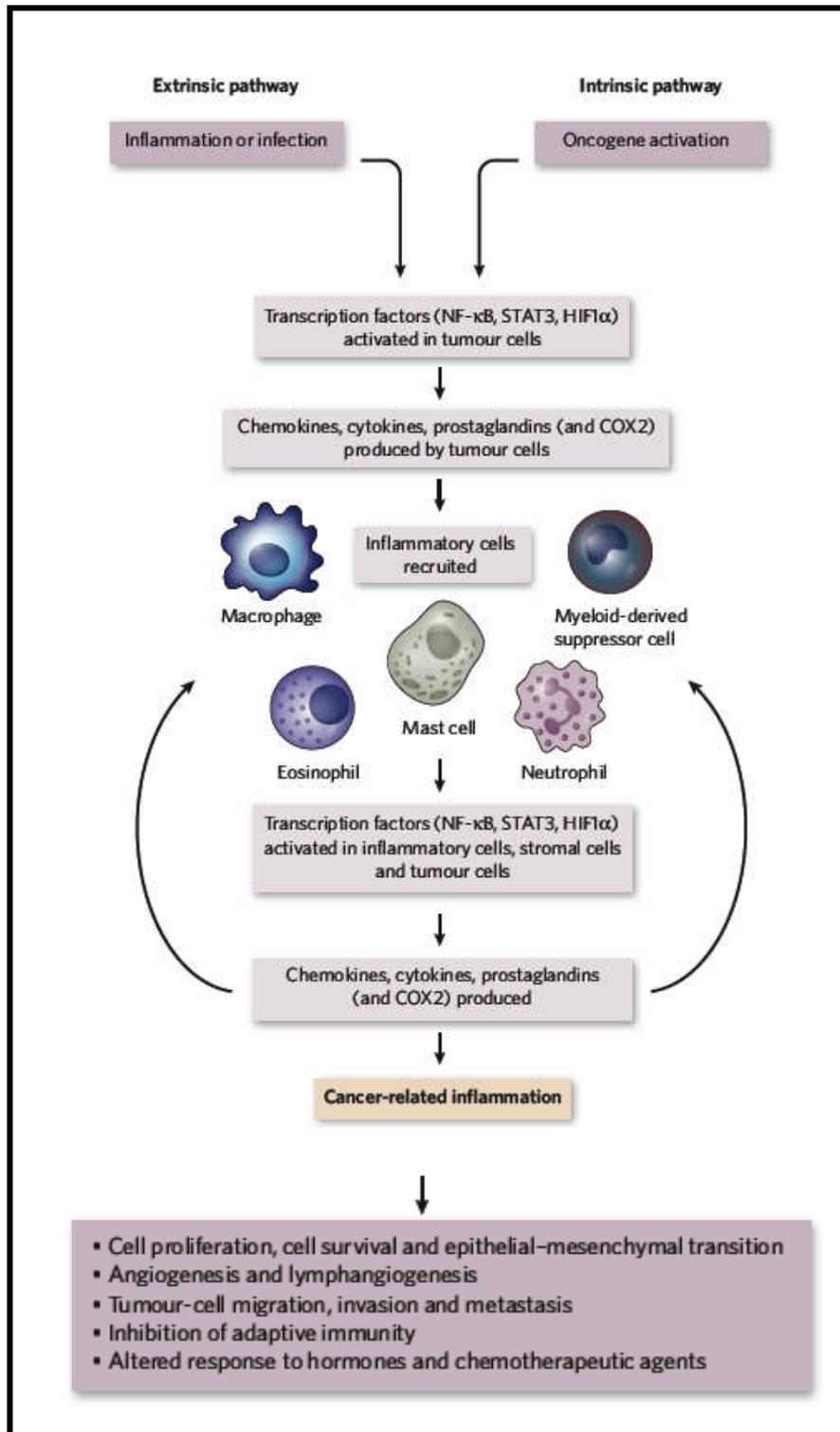


Figure 10 : Voies liant l'inflammation au cancer (Mantovani *et al.*, 2008)

# Chapitre 3

# Angiogénèse

## **1- Définition de l'angiogénèse**

L'angiogénèse ou néovascularisation désigne l'ensemble des étapes du développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène est impliqué dans d'autres processus physiologiques tel que le développement embryonnaire. Chez l'adulte, ce mécanisme est peu fréquent (il est observé par exemple au cours du cycle menstruel chez la femme), (**Goede et al., 1998**).

## **2- L'angiogénèse physiologique**

Chez l'embryon, la vasculogénèse correspond à la différenciation à partir du mésoderme des hémangioblastes en angioblastes sous l'effet de plusieurs facteurs (FGF2, VEGF-A ...). Ces angioblastes se différencient en cellules endothéliales (**Risau, 1997**), qui s'assemblent après en tube (réseau vasculaire primitif). Cette étape est suivie de l'angiogénèse c'est-à-dire, une croissance et un remodelage formant un réseau plus complexe.

Chez l'adulte, la formation d'un vaisseau se résume en un seul processus qui est l'angiogénèse. Elle met en jeu plusieurs types cellulaires et moléculaires. On peut citer parmi les cellules (**Hirschi & D'Amore, 1996**) :

- cellules endothéliales : elles initient l'angiogénèse,
- cellules péri-endothéliales : permettent la maturation des vaisseaux,
- cellules murales : essentielles pour la stabilisation des vaisseaux, en empêchant la régression et la rupture des vaisseaux, la migration, la prolifération des cellules endothéliales et la stimulation de la production de la matrice extracellulaire.

### **2-1- Régulation moléculaire de l'angiogénèse**

L'angiogénèse est régulée grâce à un équilibre entre des facteurs qui la favorisent et d'autres qui l'inhibent. On peut la présenter sous forme d'une balance où, sur un de ses plateaux, on trouve les facteurs activateurs. Sur l'autre, on a les facteurs inhibiteurs. Le déséquilibre entre ces facteurs peut conduire à une angiogénèse pathologique telle que la néovascularisation des tumeurs. (**Folkman, 1995**). Ces molécules peuvent être des cytokines, des chimiokines, des hormones, des neuropeptides, des protéines de la MEC ou encore des protéases.

Dans le tableau 5, nous résumons les facteurs les plus étudiés qui régulent ce processus.

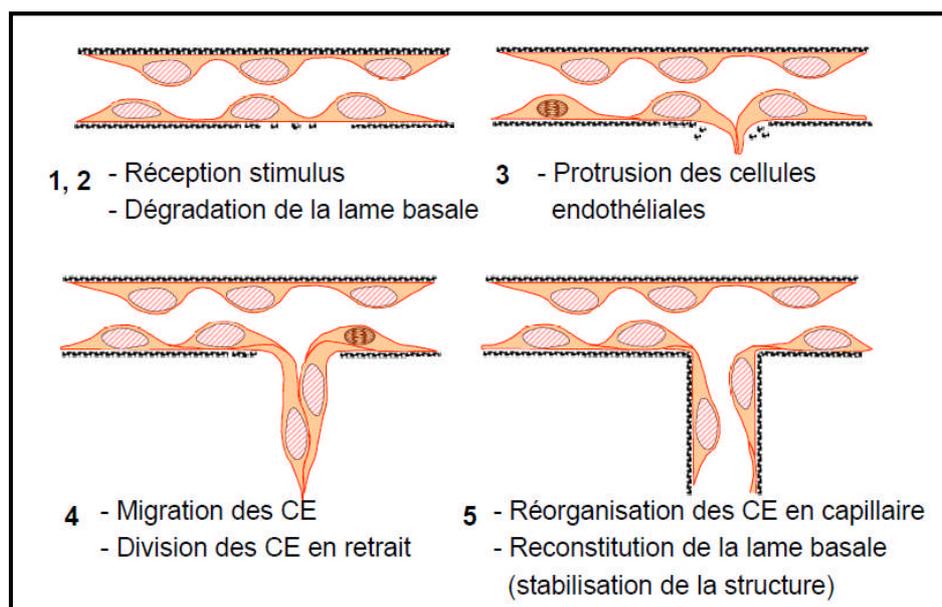
**Tableau 5 (synthèse):** Les facteurs pro et anti-angiogéniques.

Facteurs pro-angiogéniques	Expression	Isoformes	Récepteurs/ligands	Effets
<b>VEGF</b> (Shweiki 1992; Shalaby, 1995 ; Carmeliet <i>et al.</i> , 1996; Fong, 1999)	-cellules cancéreuses (régulée par les MMP)	VEGF-A VEGF-B VEGF-C VEGF-D PlGF (Placental Growth Factor)	-deux types : VEGFR-1/Flt-a et VEGFR-2/KDR -Récepteur RTK sur les cellules endothéliales	-migration et prolifération des cellules endothéliales -stimulation des cellules inflammatoires (macrophage/monocyte)
<b>FGF</b> (Partanen <i>et al.</i> , 1993 ; Giordano <i>et al.</i> , 1996 ; Friesel & Maciag, 1999)	cellules nécrotiques et lors de la dégradation de la MEC	22 membres Exemples : FGF a , FGF b	-FGFR, sur les fibroblastes	-la cicatrisation et le développement embryonnaire -recrutement des cellules inflammatoires et la multiplication des cellules endothéliales et leur organisation en tube.
<b>PDGF</b> (Mannic, 2009 ; Benslimane-Ahmim, 2013)	Cellules endothéliales	PDGF-A PDGF-B PDGF-C PDGF-D	- PDGFR, RTK	-régule la multiplication, la migration cellulaire et la formation des vaisseaux ainsi que leur croissance.
<b>Système angiopoïétine</b> (Hanahou,1997 ; Mais onpierre <i>et al.</i> , 1997 ; Witzenbichler <i>et al.</i> , 1998 ; Ferrara, 1999 ; Holash <i>et al.</i> , 1999 ; Pepper, 2000 ; Thurston <i>et al.</i> , 2000 ; Jain, 2003 )	-cellules endothéliales -cellules murales	Ang 1(activ) Ang 2 (inhib)	Récepteur : Tie sur les cellules endothéliales	<b>-ang 1 :</b> -formation et stabilisation des vaisseaux -recrutement des cellules péricytaires <b>-ang 2 :</b> -contrôle l'activité de l'ang1 et stimule l'angiogénèse en activant le VEGF

## 2-2- Mécanismes de l'angiogénèse physiologique

Sous l'effet du VEGF et du NO, les vaisseaux subissent une vasodilatation, ce qui facilite l'extravasation des protéines plasmatiques et la migration des cellules endothéliales. Le complexe ang1-Tie 2 inhibe la perméabilité ce qui resserre les jonctions cellulaires (Maisonpierre *et al.*, 1997 ; Gamble *et al.*, 2000). Ang 2 à son tour, induit le détachement des cellules musculaires lisses et le relâchement de la MEC. La dégradation de la MEC par les différents types d'enzymes est une étape clé dans l'angiogénèse car elle permet la libération des facteurs encastrés dedans tels que le VEGF et le FGF b. La liaison du VEGF avec son récepteur entraîne la prolifération des cellules endothéliales et leur migration. Ce chimiotactisme est également assuré par l'ang1. Cette dernière induit la maturation et la stabilisation des vaisseaux (Maisonpierre *et al.*, 1997 ; Suri *et al.*, 1998 ; Ferrara, 1999 ; Stetler-Stevenson, 1999 ; Gamble *et al.*, 2000 ; Thurston *et al.*, 2000).

L'étape qui suit est le bourgeonnement. Elle repose sur l'équilibre entre les facteurs activateurs et inhibiteurs. Les facteurs inhibiteurs comme l'endostatine, l'interféron  $\beta$ , agissent sur les cellules endothéliales en empêchant leur prolifération et leur migration. Ces dernières s'assemblent en formant un tube et entrent en quiescence. Cela permet l'acquisition de la lumière. Le VEGF et l'ang1 permettent l'augmentation du diamètre du vaisseau. La formation du réseau endothéliale nécessite sa maturation, son organisation et l'uniformisation des capillaires (figure 11). Cela implique un grand nombre de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF, Tie-1, l'intégrine (Carmeliet *et al.*, 1996; Patan, 1998 ; Carmeliet *et al.*, 1999).



**Figure 11 :** Angiogénèse physiologique et formation d'un nouveau vaisseau (Pelletier, 2011).

### 3- L'angiogénèse pathologique

#### 3-1- Définition

L'angiogénèse est fréquemment impliquée dans certaines pathologies à savoir : les maladies inflammatoires, les maladies de la rétine, la croissance tumorale et le développement des métastases (Carmeliet & Jain, 2000). L'angiogénèse pathologique diffère de l'angiogénèse physiologique par quelques points. En effet, l'angiogénèse pathologique est activée suite à une inflammation incontrôlée et cela par les cellules de l'immunité innée (macrophages, plaquettes...). Ces dernières produisent les différents facteurs pro-angiogéniques (VEGF, bFGF, PDGF, TNF $\alpha$ ...) (figure 12) et dont le rôle est l'activation des cellules endothéliales (Couffinhall *et al.*, 1999).

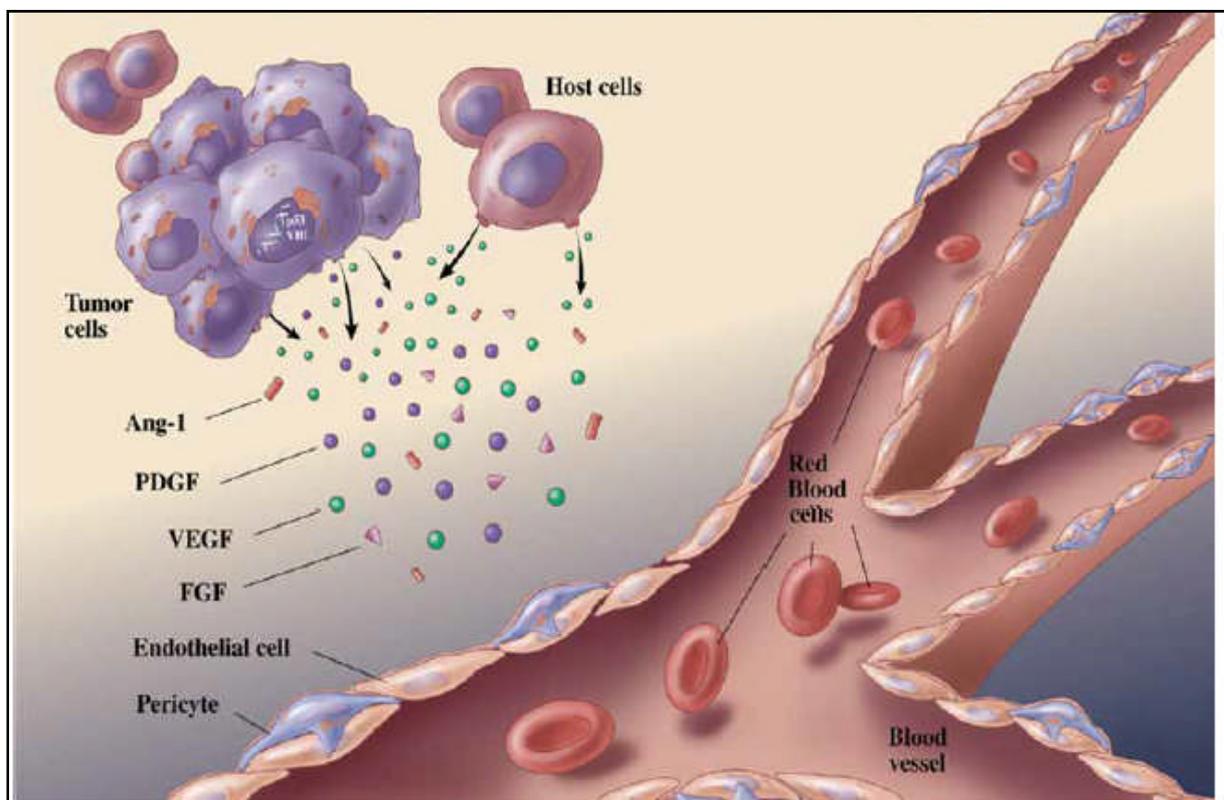


Figure 12 : Mécanismes cellulaire et moléculaire de l'angiogénèse (Pelletier, 2011)

#### 3-2- Angiogénèse tumorale

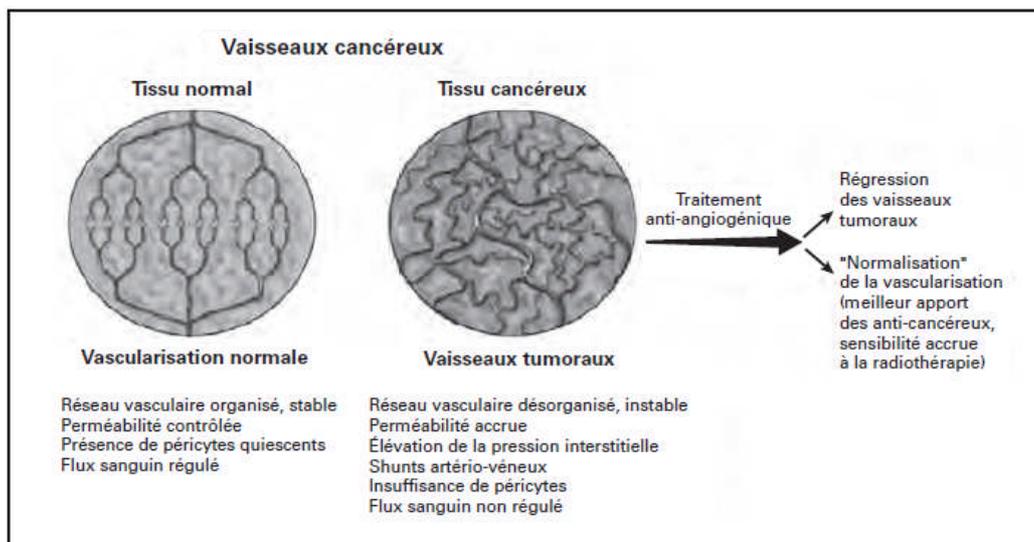
Cette notion a été introduite pour la première fois en 1945 ; on proposa que les cellules tumorales pouvaient induire la croissance de nouveaux vaisseaux au cours de leur développement. Quelques années plus tard, **Folkman** proposa que les cellules tumorales initient une angiogénèse grâce à la production des molécules dites pro-angiogéniques

« TAFs: Tumor Angiogenic Factors » et qu'en bloquant ces facteurs leur croissance peut être stoppée (Kerbel, 2000).

La néovascularisation est nécessaire au développement et la croissance tumorale pour permettre l'apport et la diffusion des nutriments et l'élimination des déchets. Ce phénomène appelé « Switch angiogénique » ou « commutation angiogénique » sépare deux phases du développement tumorale ; la première phase dite pré-invasive dans laquelle le diamètre de la tumeur ne dépasse pas 1-2 mm et la cellule tumorale peut se diviser et/ou mourir par apoptose. La deuxième phase est caractérisée par une vascularisation intense, il en découle les métastases et l'invasion tumorale des autres tissus sains (Papetti & Herman, 2002)

L'inhibition de l'angiogénèse entraîne l'inhibition de la croissance tumorale et par conséquent, le nombre de cellules malignes diffusées dans la circulation diminue (Weidner *et al.*, 1992 ; Zetter, 1998). En d'autres termes, la régression des vaisseaux permettrait la régression de la tumeur. Il faut noter que les tumeurs sont richement vascularisées ce qui leur confère un potentiel métastatique important. La caractéristique de leurs vaisseaux est qu'ils sont immatures et perméables. Ils ont peu de jonctions intercellulaires et une petite lame basale (figure 13).

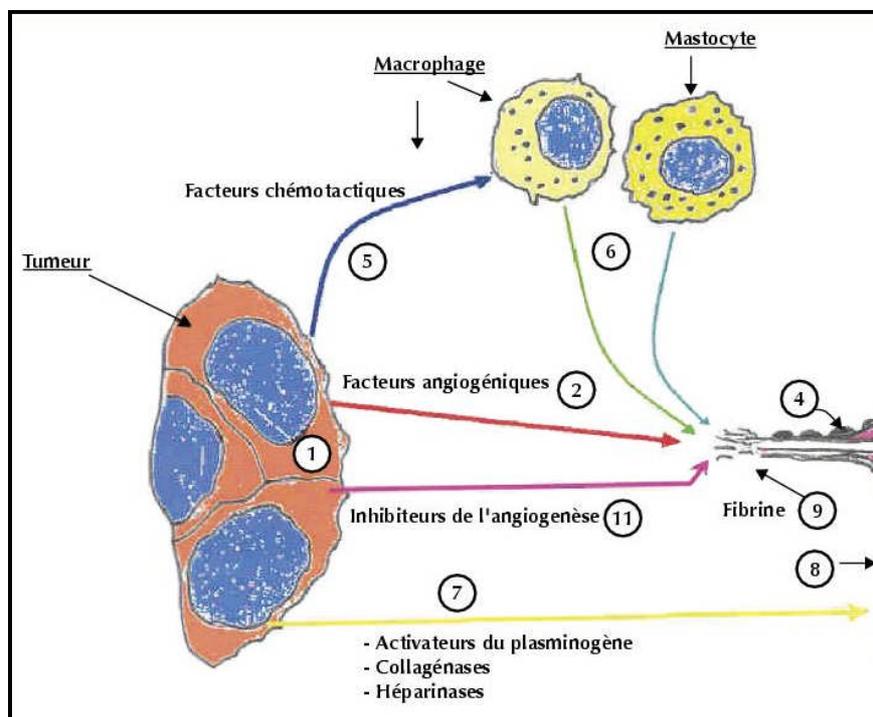
Des études cliniques ont montré une corrélation entre la concentration des facteurs angiogéniques, les métastases et le mauvais pronostic du cancer (cancer rénal, cancer du sein,...) (Folkman, 1995).



**Figure 13:** Vascularisation d'un tissu sain et d'un tissu tumoral (Corvol, 2008).

### 3-2-1- Rôle de l'inflammation dans l'angiogénèse tumorale

Par le biais de ces cellules (monocytes et macrophages), l'inflammation contribue à l'angiogénèse, en libérant les cytokines et les chimiokines et la sécrétion des héparinases, entraînant la migration et l'invasion tumorale (**Figure 14**) (**Mannic, 2009**). En plus de leur rôle pro-angiogénique, des chercheurs ont pu mettre en évidence le rôle inhibiteur de l'angiogénèse de certaines cytokines (INF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-13, TGF $\beta$  et le TNF $\alpha$ ) (**Fajardo, 1992 ; Sgadari, 1996**).



**Figure 14** : implication des cellules inflammatoires dans l'angiogénèse tumorale (**Metges et al., 2005**).

### 3-2-2- Rôle des métalloprotéases dans l'angiogénèse

L'angiogénèse peut contribuer à la progression du cancer de différentes façons (**Robin, 2000**). En effet, la vascularisation de la tumeur est une étape essentielle à son développement. Les tumeurs sont capables d'envahir les différents tissus de l'organisme et former des métastases en modulant l'expression des enzymes appelées les *Métalloprotéases Matricielles* « MMP ».

Ces protéases permettant la dégradation de la lame basale de la tumeur, sont capables d'induire l'angiogenèse tumorale nécessaire pour leur croissance par la libération de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF-2...).

- **Structure des MMPs et leur régulation**

C'est une famille de 24 protéases dont la première a été découverte en 1962 (**Roy, 2007**). Elles présentent des homologies structurales. Elles comportent trois domaines : un domaine catalytique dépendant du zinc et un prodomaine qui est responsable du maintien de la forme inactive de l'enzyme (**figure 15**). En effet, ces endopeptidases sont produites sous leur forme inactive (zymogène) (**Birkedal-Hansen et al., 1993**). L'acquisition l'activité enzymatique nécessite un clivage au niveau du domaine N-terminal inhibiteur (**Nagase, 1997**). Cela donne naissance à une molécule active caractérisée par une diminution du poids moléculaire et l'exposition du site actif. Les MMPs contiennent aussi une région charnière et hemopexine au niveau de l'extrémité C-terminale, responsable de la spécificité enzymatique (**Zuker & Vacirca, 2004**). Selon leurs substrats, les MMPs sont classées en collagénases, stromélysines, gélatinases et MMP membranaires (**Frankowski et al., 2012**).

- **Les collagénases** : ces enzymes dégradent le collagène. Cette classe comprend la MMP-1, 13 et 8. Ces enzymes dégradent le collagène.
- **Les stromélysines** : ces MMPs dégradent les différents composants de la membrane basale : le collagène type IV, la fibronectine et l'élastine. Elle comprend la MMP-3, 10, 7 et 12.
- **Les gélatinases** : on y trouve MMP-2 et MMP-9. Ces enzymes possèdent plusieurs substrats (la gélatine, le nidogène et la laminine)
- **MMP membranaires** : dégradent le collagène I, II et III, la gélatine, la fibronectine, la laminine.

L'activité des MMPs peut être inhibée spécifiquement par un autre groupe de molécules : « TIMPs » ou « Tissue Inhibitors of Metalloproteinases ». Ces inhibiteurs se lient au site actif de des enzymes et inhiber ainsi leur activité catalytique (**Murphy & Willenbrock, 1995**).

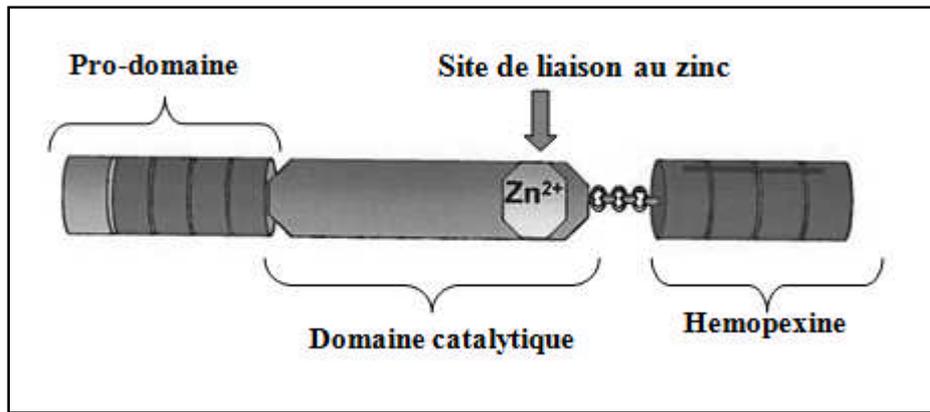


Figure 15: Structure de la MMP (Roy, 2007).

#### 4- Ciblage de l'angiogénèse dans les thérapies

La compréhension des différents mécanismes cellulaires et moléculaire impliqués dans l'angiogénèse a permis aux chercheurs de développer de nouvelles molécules thérapeutiques bloquant ces différentes voies. Cela a été réalisé par différents moyens.

- **Par des anticorps monoclonaux (ACM):** ces ACM sont dirigés contre des molécules ayant un effet activateur de l'angiogénèse ; empêchant ainsi leur liaison avec leurs récepteurs (ACM anti-VEGF, ACM anti- TNF $\alpha$ ...), (Deligne et Teillaud, 2013).

- **Par des biomolécules :** des équipes de recherche à travers le monde ont testé les effets de divers produits naturels sur l'angiogénèse et la croissance tumorale *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. Parmi ceux-ci on peut citer:

- *des extraits de cartilage de requin* qui inhibent les MMPs (Lee & Langer, 1983).
- *molécule bioactive isolée de l'escargot Fulica achatina.*

Des chercheurs ont pu isoler à partir d'un escargot terrestre une molécule appelée acharan sulfate. Ce glycosaminoglycane possède une activité anti-tumorale qui est en relation avec l'inhibition de l'angiogénèse et l'inhibition du FGF. Cette molécule a aussi un effet inhibiteur sur la formation des tubes par les HUVEC (Human Umbilical vein Endothelial cells) *in vivo*. (Kim *et al.*, 1996 ; Ghosh *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2007.

# Chapitre 4

## Cancer

## **1- Généralités**

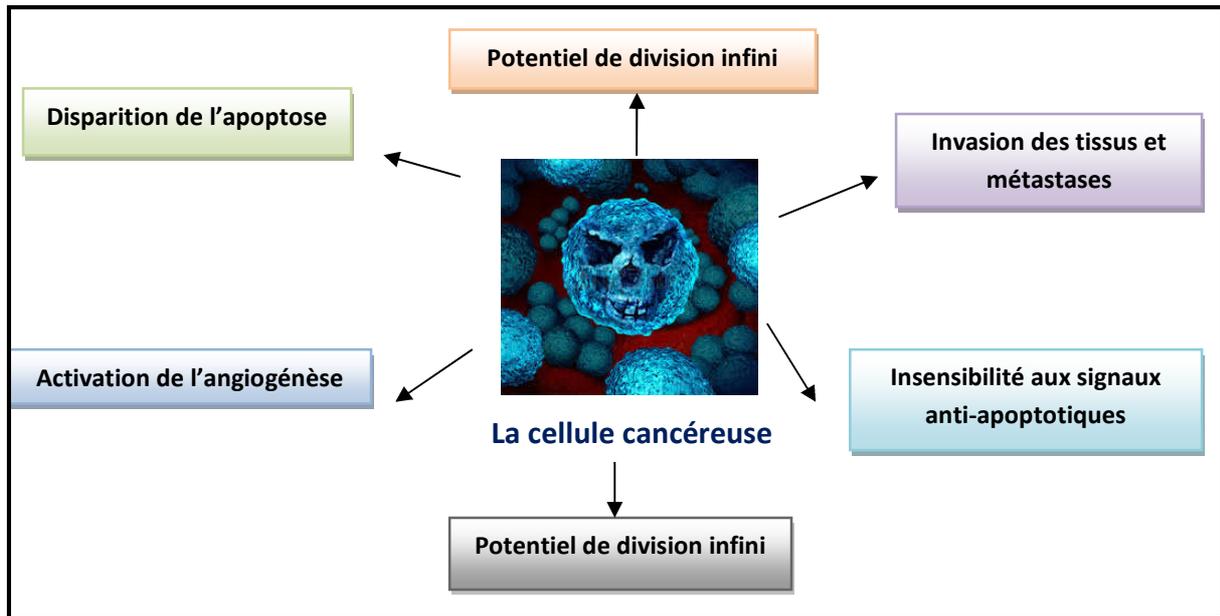
### **1-1- Définition du cancer**

Le cancer est un groupe de maladies qui peuvent toucher les deux sexes et n'importe quelle partie de l'organisme. Dans 184 pays, il existe 28 types de cancer différents. Le cancer se manifeste lorsque le contrôle qui guide la croissance normale de la cellule est rompu. Il en résulte une perturbation de l'homéostasie tissulaire. En effet, toutes les cellules de mammifères possèdent des systèmes régulés qui contrôlent et surveillent leur multiplication, différenciation, survie et mort. La cellule cancéreuse quant à elle, elle a subi des mutations au niveau des gènes régulant sa croissance, ce qu'il lui confère quelques caractéristiques qui la rend différente des cellules normales de l'organisme (**figure 16**) (**Hueber *et al.*, 1997 ; Evan & Littlewood, 1998 ; Hanahan & Weinberg, 2000 ; Ghobrial *et al.*, 2005**).

### **1-2- Formation des tumeurs et l'invasion tumorale**

En raison de la prolifération anarchique et incontrôlée de la cellule cancéreuse dans son tissu d'origine, on a une formation d'un amas cellulaire qui devient de plus en plus gros. Cette masse est appelée une tumeur primaire (**Hanahan & Weinberg, 2000**).

A partir de la tumeur primaire, des cellules malignes peuvent se détacher et migrer vers d'autres tissus et y forment un foyer tumoral secondaire, c'est ce qu'on appelle une métastase (**Hanahan & Weinberg, 2000**). Ce processus est soutenu par une variété de molécules produites telles que : les molécules d'adhésion qui facilite le passage des cellules tumorales à travers les vaisseaux sanguins et l'invasion des autres organes ; des enzymes (MMP-2 et MMP-9) qui dégradent la lame basale et rend la migration plus facile (voir plus loin) et enfin des molécules angiogéniques (VEGF) (**Deryugina & Quigley, 2005 ; Schmidmaier & Baumann, 2008 ; Citak, 2008**).



**Figure 16:** Caractéristique d'une cellule cancéreuse

## 2- Bases moléculaires de la cancérogénèse

La cancérogénèse est un processus évolutif multi-étapes. L'étude des mécanismes de l'oncogenèse a pu démontrer l'hétérogénéité des facteurs moléculaires ainsi que les voies de signalisation activées par ces différentes molécules.

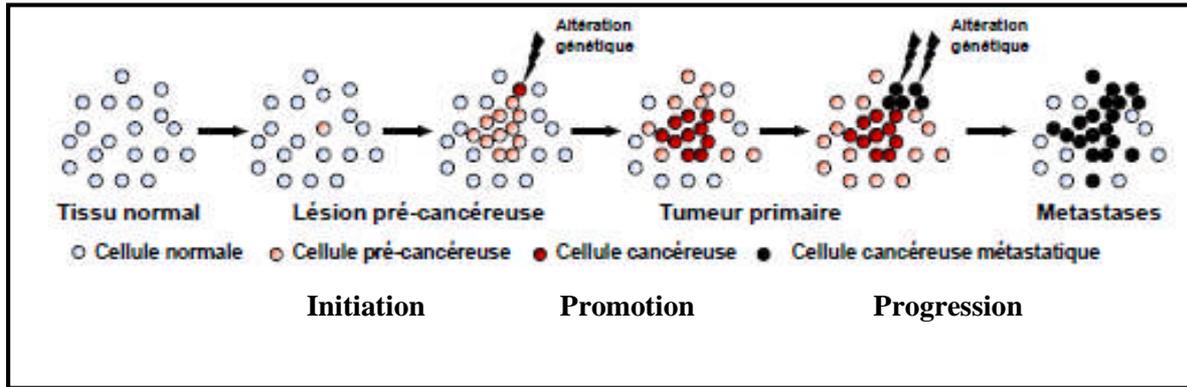
### 2-1- Étapes du développement d'un cancer

Différentes étapes ont été identifiées dans le développement d'un cancer (**figure 17**).

*L'initiation* : c'est une phase de contact avec l'agent cancérigène. Dans un premier temps, il se produit une lésion au niveau de l'ADN de la cellule. La cellule est appelée cellules pré-néoplasique. Elle ne s'est pas encore transformée.

*La promotion* : au cours de la quelle la cellule se transforme, se développe et prolifère en formant un groupe de cellules identiques.

*Progression* : durant cette phase, la cellule devient autonome, elle acquiert les caractéristiques d'une cellule cancéreuse. Elle se multiplie de façon anarchique, en perdant en partie son caractère différencié. Cette phase favorise l'apparition de nouvelles mutations spontanées dues à des erreurs de répllication de l'ADN. Ce qui entraine une instabilité du génome (**Rando, 2007**).



**Figure 17:** étapes et stades du cancer (Yokota, 2000)

## 2-2- Processus de transformation tumorale

La transformation tumorale est la capacité de conversion d'une cellule saine en une cellule maligne (Monot, 2015). La division cellulaire est contrôlée par le cycle cellulaire au cours duquel, l'ADN altéré se répare et la cellule endommagée est détruite. Le dérèglement des systèmes de réparation régit et contrôle l'avancement du cycle cellulaire. Ces systèmes sont responsables de la prolifération incontrôlée des cellules.

Il existe deux types de modifications conduisant la cellule saine à se transformer.

### a- Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

La majorité des protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeurs fonctionnent comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire (Karp, 2010). Il existe environ une vingtaine de gènes, parmi lesquels on trouve la protéine P53. Cette dernière est un régulateur majeur de l'apoptose, son rôle étant le contrôle de l'intégrité de l'ADN, la réparation et la régulation du cycle cellulaire. La mutation de la P53 est retrouvée dans 50% des cancers. La P53 mutée acquiert d'autres fonctions telles que l'interaction avec les facteurs de transcription. Elle a un effet sur l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et la transduction des signaux de survie qui conduisent à une prolifération incontrôlée et à une résistance à l'apoptose (Yokota, 2000 ; Monot, 2015).

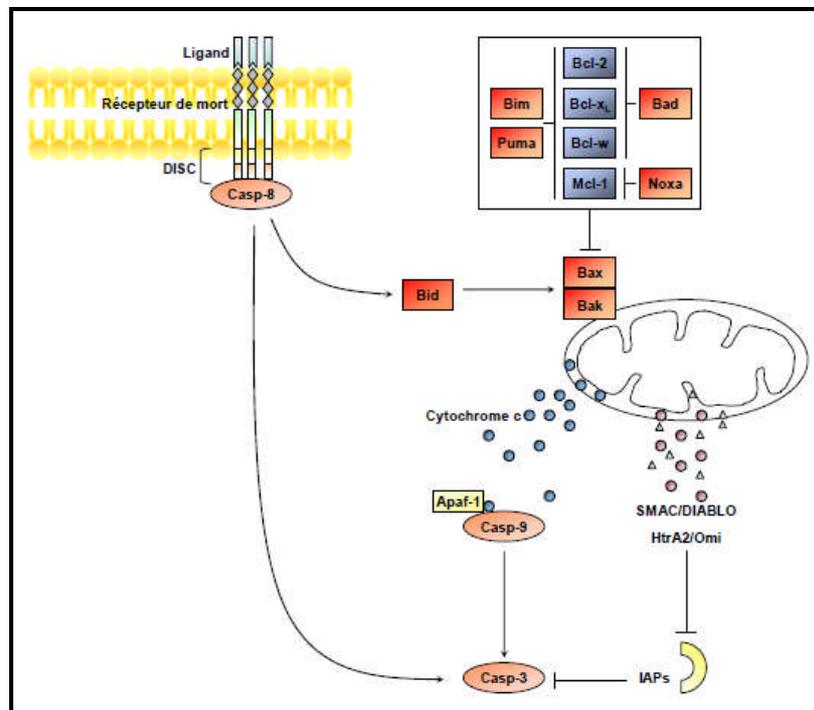
L'apoptose est l'un des moyens de destruction des cellules qui sont incapables de se diviser normalement. C'est un processus de mort cellulaire hautement régulé. Elle est contrôlée par deux voies de signalisation (figure 18). L'une fait intervenir des récepteurs de « mort », avec un

domaine de mort intracellulaire (Death Domain). La deuxième voie, régulée par les protéines de la famille Bcl-2 qui impliquent le relargage du cytochrome C de la mitochondrie. Les deux voies aboutissent à l'activation d'enzymes protéolytiques appelées CASPASES (Cysteine Aspartate Specific Proteases) (**Krammer, 2000 ; Roux & Lambert-Comeau, 2005**).

b- Activation des proto-oncogènes:

Un proto-oncogène est un gène qui participe à la transformation des cellules lorsqu'il n'est pas régulé. Il confère à la cellule son autonomie de croissance. Le proto-oncogène Ras est le plus fréquent dans les cancers. La protéine Ras est une protéine qui régule les voies de contrôle de prolifération cellulaire. (**Yokota, 2000 ; Lechat, 2006 ; Krap, 2010**). La conversion d'un proto-oncogène en un oncogène est la conséquence

- d'une transformation virale,
- d'une mutation,
- d'une translocation,
- d'une amplification.



**Figure 18** : Les deux voies apoptotiques ainsi que leurs différents effecteurs (**Bruin & Medema, 2008**)

### 3- Thérapies anticancéreuses

Les mécanismes de l'oncogenèse constituent un axe de recherche privilégié dont le but est de trouver de nouvelles cibles et une meilleure prise en charge thérapeutique. Il existe plusieurs moyens pour traiter les maladies cancéreuses (**Pasquet, 2011**).

- **La chirurgie** : constitue le premier traitement utilisé contre les petites tumeurs solides. Elle consiste en l'ablation de la tumeur et est souvent associée à d'autres thérapies.
- **La radiothérapie** : elle est basée sur l'ionisation et agit localement. C'est une alternative à la chirurgie.
- **L'hormonothérapie** : comme son nom l'indique, cette thérapie est dépendante des hormones, son objectif est l'arrêt de la production d'une hormone donnée. Elle est efficace contre certains cancers, tels que le cancer du sein et de la prostate.
- **L'immunothérapie** : approches thérapeutiques en cours de développement, elle utilise comme cible le système immunitaire de l'hôte en contrôlant sa prolifération et ses mécanismes. On y trouve les anticorps monoclonaux (**tableau 6**) et les cytokines (INF, IL...)
- **La chimiothérapie** : le but de cette thérapie est le blocage de la prolifération et la diminution de la taille de la tumeur. Elle prévient aussi la formation de foyers secondaires.

Malheureusement, la chimiothérapie ainsi que la radiothérapie peuvent avoir des effets toxiques sur les cellules saines.

**Tableau 6** : Quelques anticorps monoclonaux à usage thérapeutique en oncologie (**Deligne & Teillaud, 2013**).

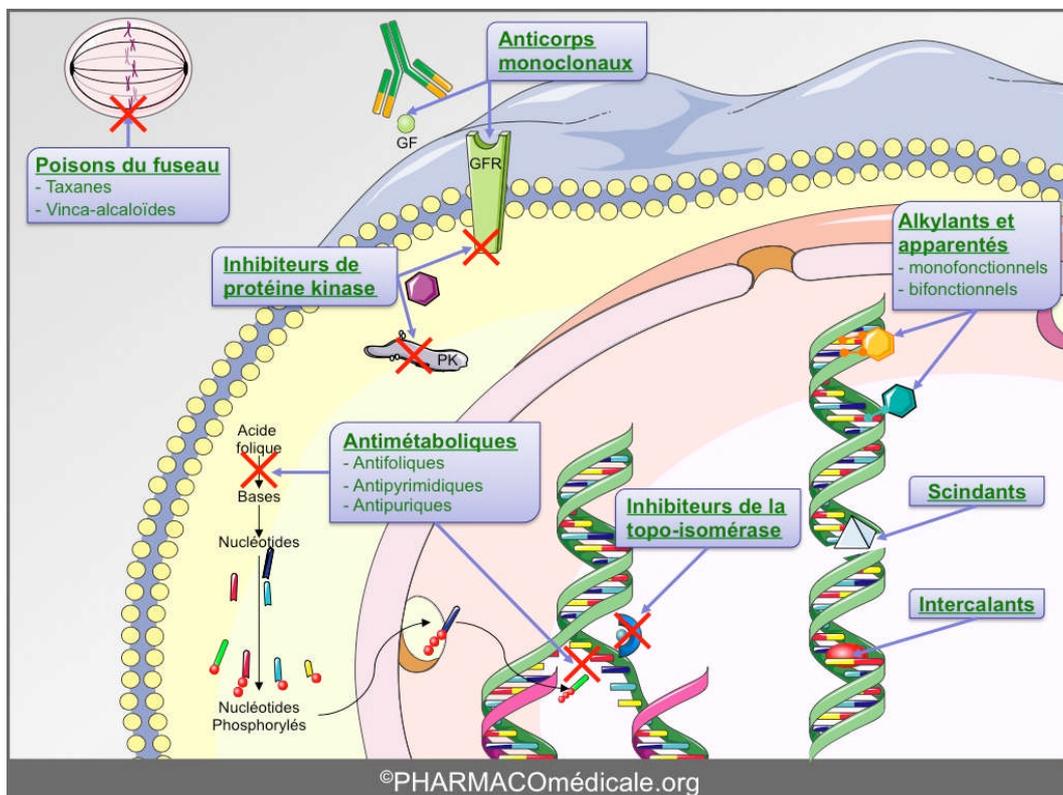
Non de l'anticorps	Cible	Indication
Rituximab (Mabthera®)	CD20	LNH : lymphome non hodgkinien
Trastuzumab (Herceptine®)	HER2/neu	Cancer du sein
Bévacizumab (Avastin®)	VEGF-A	Cancer colorectal
Cétuximab (Erbix®)	EGF-R	Cancers de la tête et du cou
Pertuzumab (Perjeta®)	HER2/neu	Cancer du sein

#### 4- Cibles des thérapies anticancéreuses

Parmi les cibles des thérapies utilisées dans le domaine de cancérologie, nous avons :

- **L'ADN** : il constitue la principale cible des traitements. Les molécules anticancéreuses agissent soit par interaction par liaison à l'ADN comme les agents alkylants ou bien par interaction avec le système de réparation comme les inhibiteurs de la topo-isomérase (**Pasquet, 2011**).
- **Le fuseau mitotique** : les molécules anticancéreuses perturbent sa formation afin d'empêcher la division cellulaire (**Pasquet, 2011**).

Il existe d'autres types de cibles thérapeutiques telles que : le cycle cellulaire, des inhibiteurs enzymatiques, des antimétabolites... (**Figure 19**).



**Figure 19** : Quelques cibles dans la thérapie anticancéreuses (1).

GF: Growth Factor = Facteur de croissance, GFR: Growth Factor Receptor = Récepteur du Facteur de croissance, PK: Protéine Kinase

# **III- Matériels**

## **et**

# **Méthodes**

### Chapitre 1 : Extraction et étude physico-chimique des extraits d'*Helix aspersa*

#### 1-1- Matériel biologique

##### *L'escargot Helix aspersa :*

*Helix aspersa* a été récolté pendant la saison de printemps dans différentes régions de l'Est Algérien. L'animal a été maintenu dans des bacs en plastique au laboratoire à température ambiante ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ). Il a été nourri de laitue, de concombre et de carotte.

#### 1-2- Préparation de l'homogénat d'*Helix aspersa*

Le gastéropode *Helix aspersa* est dépouillé de sa coquille, sa masse viscérale est éliminée, le pied avec la tête est récupéré, broyé et homogénéisé à l'aide d'un homogénéiseur (*DAIHAN scientific-HG15AO90331601*) à une vitesse de 20 t/min pendant 20min. Une partie de l'homogénat obtenue est pesée et congelée avant son utilisation pour l'évaluation de l'effet protecteur de la chair d'escargot contre l'hépatotoxicité induite par un médicament immunosuppresseur. L'autre partie est lyophilisée à l'aide d'un lyophilisateur (Labconco, France) et conservée à sec. Elle est utilisée dans la préparation des extraits.

#### 1-3- Préparation des extraits aqueux, hydroalcoolique et organique

Les trois extraits sont préparés à partir de l'homogénat lyophilisé de la chair d'*Helix aspersa*, selon la méthode de **El-Wahidi et al. (2011)** avec quelques modifications. En effet, le lyophilisat est extrait trois fois par un volume d'eau distillée stérile, filtré sur Büchner, les trois filtrats obtenus sont réunis et constituent l'extrait aqueux (EA). EA est congelé à  $-30^\circ\text{C}$ . Le culot obtenu de la filtration est extrait une fois par de l'éthanol à 80 %, puis deux fois par l'éthanol absolu et filtré sur Büchner. Les trois filtrats sont réunis et évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi) jusqu'à la fin de distillation de l'éthanol. La suspension est ajustée par de l'eau distillée à 50ml puis extraite trois fois avec 50 ml de dichlorométhane (BIOCHEM, Chemopharma). Les deux phases, aqueuse et organique, sont séparées à l'aide d'une ampoule à décompter. La phase aqueuse est congelée et constitue l'extrait hydroalcoolique (EH). Le dichlorométhane est évaporé de la phase organique. Le produit obtenu constitue l'extrait organique (EO). Ce protocole d'extraction est récapitulé dans la **figure 20**. Par la suite, les effets anti-inflammatoire (*in vivo*), anti-tumoral et anti-angiogénique (*in vitro*) des trois extraits EA, EH et EO sont évalués.

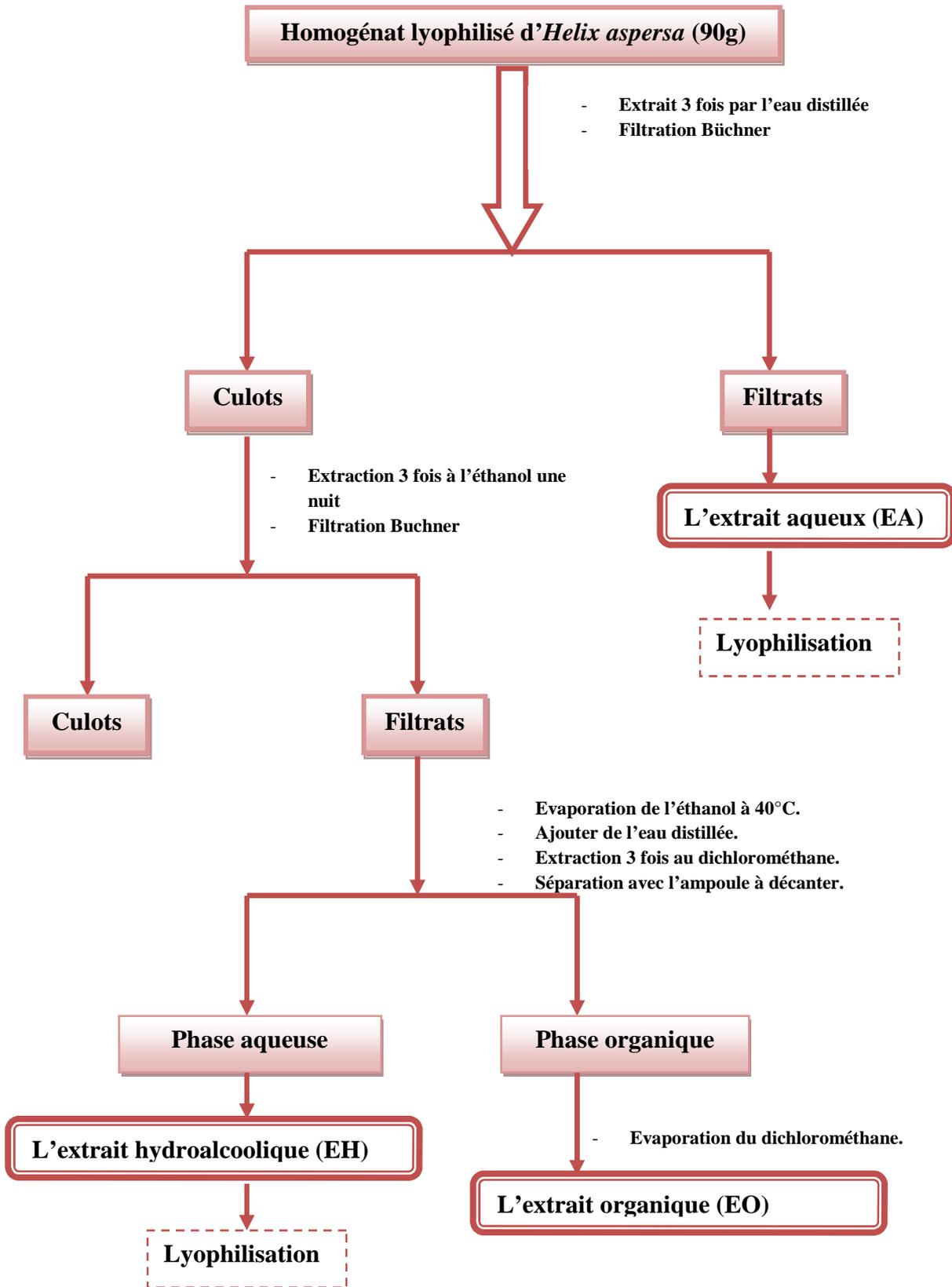


Figure 20 : Protocole d'extraction adopté pour l'escargot *Helix aspersa*

### 1-4- Test de quelques molécules chimiques

Dans la procédure d'extraction, nous avons utilisé trois types de solvants à différentes polarités, ce qui permet d'extraire des molécules de polarité différente. L'extrait aqueux contient des molécules très polaires, l'extrait hydroalcoolique contient des molécules peu polaires. En revanche, l'extrait organique contient des molécules non polaires. Afin d'identifier les différentes substances chimiques présentes dans la chair homogénéisée ainsi que dans les différents extraits de l'escargot *Helix aspersa*, nous avons réalisé un screening chimique.

#### 1-4-1- Dosage des protéines totales dans les deux extraits aqueux et hydroalcoolique

##### - Principe

Les protéines sont dosées selon la méthode de **Bradford (1976)**. Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu de Coomassie à  $\lambda = 595$  nm, après complexation avec les résidus hydrophobes des acides aminés ainsi que les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine), présents dans l'échantillon. Le changement d'absorbance est proportionnel à la concentration en protéines dans l'échantillon.

##### - Protocole

On ajoute 5 ml du réactif Bradford (annexe 1), à 100  $\mu$ L de chaque extrait avec une concentration de 1mg/mL, dilué dans du un tampon du NaCl (0.15 M). Le mélange est vortexé puis la densité optique est mesurée à  $\lambda = 595$  nm après deux minutes d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY, 7305) contre un blanc qui contient 100  $\mu$ L de tampon et 5 mL du réactif Bradford. Une courbe étalon est réalisée avec une solution de BSA (Sérum Albumine Bovine, Sigma) à différentes concentration (10-100  $\mu$ g) diluée dans le même tampon (figure 56, annexe 3).

#### 1-4-2- Estimation des protéines des extraits aqueux et hydroalcoolique sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Afin d'estimer la présence des protéines dans les extraits aqueux et hydroalcoolique, une électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (le dodécylsulfate de sodium « SDS »), (**Laemmli, 1970**). Les échantillons protéiques sont mis en contact d'un détergent anionique (SDS) et d'un agent réducteur chargé de rompre les liaisons disulfure (le 2-mercaptoéthanol). Les polypeptides sont dans ce cas dénaturés, ce

qui permet la fixation du SDS et acquièrent alors une charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.

### a- Dans l'extrait aqueux

Les échantillons à analyser sont réduits puis chauffés à 100°C pendant 5min, puis 20 µL de l'échantillon sont chargés dans les puits du gel de polyacrylamide. Après électrophorèse, le gel est coloré par une solution de bleu de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250, sigma), puis décoloré avec une solution d'acide acétique glacial et de méthanol. Le gel est finalement lavé abondamment à l'eau.

### b- Dans l'extrait hydroalcoolique

Un SDS-PAGE de l'extrait hydroalcoolique est réalisé en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide pré-coulé avec un gradient de 8-18% en acrylamide (ExcelGel, 245 x 110 x 0,5 mm, gradient 8-18 % en acrylamide, GE Healthcare). La migration électrophorétique est effectuée pendant 80 min (600 V, 50 mA, 35 W) à  $15,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ , dans un système d'électrophorèse horizontal (modèle Multihore II de chez GE Healthcare), équipé d'un générateur de courant et couplé à un cryostat (modèle Julabo F12).

L'échantillon à analyser est réduit puis chauffé à 100°C pendant 5min. 20 µL de l'échantillon sont chargés dans les puits du gel. Après la migration, le gel est ensuite coloré au nitrate d'argent (Dodeca™ silver stain kit, Biorad). Un kit de marqueurs moléculaire est utilisé (Bio-Rad, PM compris entre 14,5 et 66,2 kDa).

### 1-4-3- Dosage des polyphénols totaux dans les trois extraits : aqueux, hydroalcoolique et organique

#### - Principe

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par une méthode à base de Folin Ciocalteu élaborée par **Vermerris & Nicholson 2006**, ce réactif étant constitué d'un mélange d'acide phosphotungstiques et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la concentration en polyphénols présents dans les extraits. Le maximum d'absorption est situé entre  $\lambda=700$  et  $\lambda=750$  nm (**Ardestani & Yazdanparast, 2007**)

#### - Protocole

Un volume de chaque extrait (0,1 mL) avec une concentration de 1 mg/ml, est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2 % (m/v). Les tubes sont vortexés puis incubés

5 min à température ambiante. 100  $\mu$ L de réactif Folin Ciocalteu (SIGMA, Life Sciences) sont additionnés au mélange puis ré-incubé 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La DO est mesuré à  $\lambda=700$  nm contre un blanc qui contient 500  $\mu$ L d'eau distillée, 1 mL de Folin et 5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Une courbe d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (figure 57, annexe 3).

### 1-4-4- Mise en évidence des flavonoïdes (Bouquet, 1972)

#### - Principe

En présence de NaOH (1N), de HCl concentré et des coupeaux de cations magnésium, les flavonoïdes donnent un changement de coloration de l'échantillon.

#### - Protocole

Cinq g de l'homogénat lyophilisé de l'escargot *Helix aspersa* est resuspendu dans 50 mL d'eau distillée stérile. Le mélange est soumis à une agitation pendant 30 min. L'extrait obtenu est filtré sur papier filtre. Le filtrat est réparti en trois tubes, chaque tube contient :

Tube 1 : 6 mL de filtrat + 1 mL d'eau distillée (témoin).

Tube 2 : 6 mL de filtrat + 1 mL de NaOH (1N).

Tube 3 : 6 mL de filtrat + 1 mL de HCl concentré + des coupeaux de  $\text{Mg}^{2+}$ .

### 1-4-5- Mise en évidence de l'activité hémagglutinante des extraits aqueux et hydroalcoolique

#### - Principe

C'est un test très simple et largement utilisé (Goldstein *et al.*, 1980 ; Rudiger, 1993). Il est basé sur la liaison des protéines hémagglutinantes à des érythrocytes. Ce test repose sur l'observation de l'agglutination visible à l'œil nu (figure 21).



**Figure 21:** Test d'hémagglutination sur microplaque de titration.

- Protocole :

L'activité hémagglutinante des deux extraits EA et EH a été réalisée dans des microplaques à fond rond. Chaque puits contient 100  $\mu$ L de chaque extrait à laquelle nous avons rajouté 50  $\mu$ L de la suspension érythrocytaire à 4% en solution saline. La microplaque est agitée puis incubée pendant 45 min à 37 ° C.

## Chapitre 2 : Evaluation *in vivo* de l'effet protecteur de l'homogénat d'*Helix aspersa* contre l'hépatotoxicité induite par la cyclosporine A

### 2-1- Matériels utilisés

#### a- Matériel biologique

Des rats mâles de souche Wistar (poids vif entre 80 et 150 g), ont été utilisés lors de l'étude *in vivo*. Ces animaux proviennent de l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université des Frères Mentouri de Constantine. Ils avaient accès libre à l'eau potable et à l'alimentation standard.

#### b- Matériel chimique

*Cyclosporine* (Sandimmun (100mg/mL CsA Solution), Novartis Neoral ®, Huningue, France) est un médicament immunosuppresseur utilisé pour prévenir le rejet de greffes chez les patients greffés.

### 2-2- Protocole expérimental

Dans le but d'évaluer l'effet protecteur de la chair de l'escargot *Helix aspersa*, nous avons utilisé un médicament immunosuppresseur connu pour son effet hépatotoxique. Le protocole a été réalisé selon la méthode d'Erarslan *et al.* (2010) avec quelques modifications. L'expérience a porté sur 20 rats mâles répartis en 4 lots de 5 rats chacun.

- **Lot T** : le groupe témoin a reçu par voie orale du NaCl stérile 0.9% (m/v), pendant 22 jours.
- **Lot C** : les rats sont traités par voie orale par la cyclosporine A seul. La durée du traitement est répartie en deux périodes : les animaux ont reçu une dose de 20mg/kg pendant les 14 premiers jours du traitement et une dose de 60mg/kg, pendant les 8 jours suivants.
- **Lot CH** : Les animaux sont traités avec la cyclosporine en association avec l'homogénat d'*Helix aspersa*. Le traitement est réparti en deux périodes. Chaque rat a reçu une dose de 20mg/kg de cyclosporine accompagnée de 100mg d'homogénat, pendant les 14 premiers jours du traitement et une dose de 60mg/kg, avec 200 mg pendant les 8 jours suivants.
- **Lot H** : ce groupe est traité avec l'homogénat d'*Helix aspersa* seul par voie orale, en deux périodes aussi : durant les premiers 14 jours, chaque rat a reçu une dose de 100mg

d'homogénat par kg, ensuite ils ont reçu 200 mg d'homogénat pendant les 8 derniers jours.

A la fin des expériences, les animaux sont anesthésiés au chloroforme. Un prélèvement sanguin est réalisé à partir du sinus rétro-orbital au niveau de l'œil, sur deux tubes : un tube EDTA pour la réalisation des frottis sanguins périphériques et le comptage des différentes populations sanguines (à l'aide d'un appareil Mindray BC-2800) et un tube héparine-lithium pour récupérer le plasma qui est utilisé pour les analyses biochimiques. Le sang est immédiatement centrifugé (centrifugeuse : Hettich, EBA 8S), à 2000 x g pendant 10 minutes à température ambiante. La moelle osseuse est également prélevée sur l'animal anesthésié au niveau de l'épiphyse (fémur) pour réaliser les frottis médullaires. Le foie est prélevé, lavé et conservé à -30° C pour l'étude biochimique.

Les frottis périphériques et médullaires sont colorés par la technique de **May-Grunwald et Giemsa** (Annexe 1). L'observation des lames ainsi que la prise des photos sont réalisées à l'aide d'un microscope optique OPTECH couplé à une caméra (canon-DS126181) au laboratoire d'analyses biologiques, Faculté SNV, Constantine.

### **2-3- Etude biochimique**

#### **2-3-1- Homogénéisation du foie**

La fraction cytosolique est préparée comme suit : 1 g de foie est homogénéisé dans 3 mL de tampon phosphate contenant 1,17 M de KCl à l'aide d'un homogénéiseur. L'homogénat est centrifugé à 2000 g durant 15 min à 4 °C puis à 9000 g durant 30 minutes (centrifugeuse SIGMA, 3K30). Le surnageant obtenu est utilisé pour l'évaluation du malondialdéhyde (MDA), de l'activité enzymatique de la catalase ainsi que dans le dosage du glutathion réduit (GSH).

#### **2-3-2- Dosage des transaminases : ASAT (GTO) et ALAT (TGP)**

Nous avons utilisé pour ce dosage des Kits commerciaux (Quimica Clinica Aplicada S.A, Spain) avec un automate (Beckman coulter CX9 PRO) à  $\lambda=(334-365)$  nm.

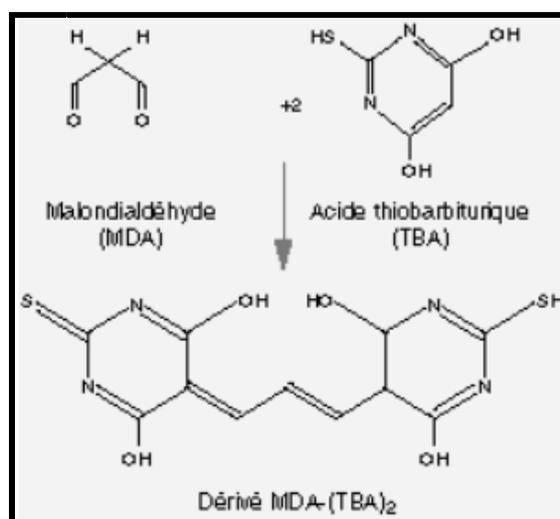
#### **2-3-3- Dosage du MDA**

La peroxydation lipidique dans le foie est évaluée par le dosage de (MDA) réalisé selon la méthode d'**Ohkawa et al. (1979)**. Le MDA est l'un des produits terminaux de la

décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress oxydatif.

### - Principe

Le MDA est dosé dans le foie par la méthode colorimétrique qui utilise l'acide thiobarbiturique (TBA). C'est une méthode très sensible car elle permet de détecter de faibles quantités de MDA libre. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C), une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de TBA ce qui entraîne la formation d'un chromogène de couleur rouge dont l'absorption maximale est comprise entre  $\lambda=312$  et  $\lambda=535$  nm. Le principe de cette méthode est résumé dans la **figure 22**.



**Figure 22:** Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique (Lefèvre *et al.*; 1998).

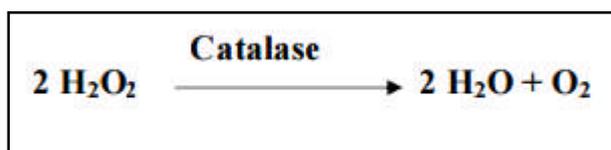
### - Extraction et dosage du MDA

Le milieu réactionnel contient 0,2 mL de la fraction cytosolique obtenue, 0,2 mL de solution SDS (8,1%), 1,58 mL d'acide acétique à 20% (pH 3,5) et 1,5 mL de TBA « acide thiobarbiturique » (0,8%). Le volume final du milieu réactionnel est ajusté à 4 mL avec de l'eau distillée. Le mélange est chauffé à 95 °C pendant 60 min, refroidi puis 1 mL d'eau distillée et 5 mL de n-butanol-pyridine sont ajoutés au milieu réactionnel. Les tubes sont agités puis centrifugés à 5000 g pendant 10 min (centrifugeuse SIGMA, 3K30). L'absorbance du surnageant est déterminée au spectrophotomètre à  $\lambda=532$  nm. La concentration du MDA est déduite à partir d'une courbe étalon établie dans les mêmes conditions avec une solution mère de TEP (1, 1, 3,3-Tetraethoxypropane), (figure 58, annexe 3). La concentration du MDA est exprimée en nmoL/gramme de foie.

#### 2-3-4- Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase

##### -Principe

L'activité enzymatique de la catalase est déterminée selon la méthode de **Clairborne, (1985)** avec quelques modifications. Le principe est basé sur la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau liquide et en dioxygène gazeux en présence de la catalase à 25 C° selon la réaction suivante :



##### -Protocole

Le mélange est constitué de 1 mL de tampon phosphate ( $KH_2PO_4$ , 0,1 M, pH 7,2), 0,975 mL de  $H_2O_2$  (SIGMA-Aldrich, USA) fraîchement préparé (0,091 M) et de 0,025 mL de la fraction cytosolique. L'absorbance est mesurée à  $\lambda=240$  nm chaque minute pendant 2 min. L'activité enzymatique est calculée selon la formule ci-dessous et exprimée en unité internationale par minute par gramme de protéines (UI / min.g de protéines).

$$UI/g = (2.3033/T) \times (\log A_1/A_2) /g \text{ de protéine.}$$

A1 : absorbance à la première minute. A2 : absorbance à la deuxième minute. T : intervalle de temps en minute.

#### 2-3-5- Dosage du glutathion réduit

##### -Principe

Le dosage du GSH est réalisé selon la méthode colorimétrique de **Beutler et al. (1963)** avec quelques modifications. Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à  $\lambda=412$  nm.

### -Protocole

Pour ce dosage, 1 mL de cytosol est mélangé avec 1 mL de TCA (BIOCHEM, chemopharma) à 10 % puis centrifugé à 1000 x g pendant 10 min à 4 °C. 2 mL de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,3 M) et 250  $\mu\text{L}$  de DTNB (0,001 M) sont additionnées à 500  $\mu\text{L}$  du surnageant obtenu après la centrifugation. L'absorbance est mesurée à  $\lambda=412$  nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Les concentrations sont exprimées en nmol/g de foie. Une courbe étalon a été établie dans les mêmes conditions avec le L-glutathion réduit (SIGMA-ALDRICH), afin de déduire la concentration du GSH, dans les différents lots traités (figure 59, annexe 3).

**Chapitre 3 : Evaluation *in vivo* de l'effet anti-inflammatoire des trois extraits aqueux, hydroalcoolique et organique (modèle pulmonaire de rat)**

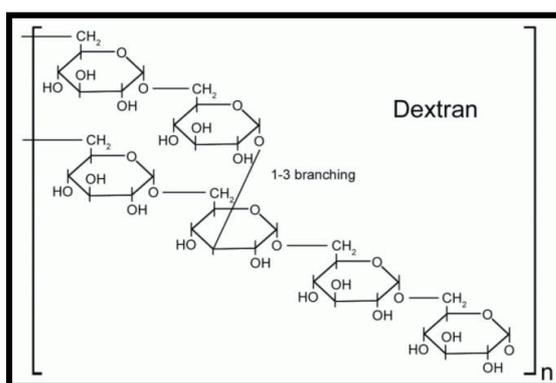
**3-1- Matériels utilisés**

**a- Matériel biologique**

Des rates femelles de souche Wistar (poids vif entre 80 et 120g), ont été utilisées lors de cette étude. Ces animaux proviennent de l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri de Constantine. Elles avaient accès libre à l'eau potable et à l'alimentation standard.

**b- Matériels chimiques**

**Séphadex G-200** : (Sephadex G-200 Superfine, Pharmacia). Il est constitué d'un polymère de dextran (figure 23).



**Figure 23:** Structure du Séphadex (Evaldsson et al., 2011)

**Médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS)**

Le médicament anti-inflammatoire utilisé est le xydol (Ibuprofène, 200mg- MERINAL). C'est un AINS non sélectif de la COX appartenant à la famille de l'acide arylpropionique (l'acide alpha-méthyl-[4-(2-méthylpropyl)phényl]propanoïque), exerçant un effet sur l'acide arachidonique.

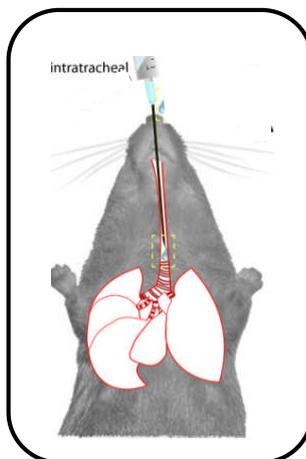
**3-2- Induction de l'inflammation pulmonaire**

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits EA, EH et EO du gastéropode terrestre *Helix aspersa*, un modèle d'inflammation aigue pulmonaire induit par le **Sephadex G-200** chez le rat, a été utilisé selon le protocole décrit par **Evaldsson et al. (2011)** avec quelques modifications. Trente rates ont été réparties en 6 groupes de 5 rates.

L'induction de l'inflammation a été réalisée par instillation intra-trachéale (**figure 24**) de 1 mL d'une solution de Séphadex (5mg/mL/kg), chez la rate anesthésiée au chloroforme, préparée 12-24h avant l'instillation dans une solution physiologique stérile. Une demi-heure après l'instillation, les rates reçoivent un volume de 1mL de chaque extrait par voie intra-péritonéale. Le traitement des différents groupes est comme suit :

- Lot T (contrôle) a reçu une solution stérile de NaCl 0.9 % (m/v) par instillation intra-trachéale effectuée avec une seringue stérile.
- Lot Sx a reçu 1mL de la solution de Séphadex (5mg/mL/kg) seul dans la trachée.
- Lot Sibu a reçu la solution de Séphadex par instillation intra-trachéale et une dose de 30mg/kg de poids corporel d'un anti-inflammatoire non stéroïdien par voie orale.
- Lot SEA a reçu la solution de Séphadex par instillation intra-trachéale et 1 mL de l'extrait aqueux à une concentration de 1mg/mL par voie intra-péritonéale, une demi-heure après l'instillation du Séphadex.
- Lot SEH a reçu la solution de Séphadex par instillation intra-trachéale et 1 mL de l'extrait hydroalcoolique à une concentration de 1mg/mL par voie intra-péritonéale une demi-heure après l'instillation du Séphadex.
- Lot SEO a reçu la solution de Séphadex par instillation intra-trachéale et 1 mL de l'extrait organique à une concentration de 1mg/mL par voie intra-péritonéale une demi-heure après l'instillation du Séphadex.

Vingt quatre heures après l'instillation et après une anesthésie au chloroforme, un prélèvement sanguin sur un tube EDTA est réalisé à partir du sinus caverneux, pour le comptage des leucocytes totaux.



**Figure 24:** Schéma représentant la méthode de l'instillation intra-trachéale.

Un lavage pulmonaire a été réalisé (24h après l'instillation) avec l'injection de 1mL d'une solution physiologique stérile dans la trachée afin de prélever le liquide broncho-alvéolaire (BALF: Broncho-Alvéolar Lavage Fluid).

Le liquide est récupéré dans des tubes eppendorfs de 2 mL puis centrifugé à 400 g pendant 5 min à 4 °C. Les surnageants sont congelés à -30°C, les culots cellulaires ont été re-suspendus dans 1 mL de solution physiologique puis dilués pour le comptage des leucocytes. Après le lavage, les poumons ont été prélevés, pesés, lavés et fixés dans du formol à 4 % pour la réalisation des coupes histologiques.

Les coupes histologiques ont été colorées à l'hématoxyline-éosine puis observées par un photo-microscope OPTECH couplé à une caméra (canon-DS126181).

### **3-3- Dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO) dans le BALF**

La MPO est une enzyme contenue dans les polynucléaires neutrophiles présents dans le parenchyme pulmonaire et le BALF. Le dosage de l'activité MPO est un facteur permettant de valider l'inflammation pulmonaire. Le dosage de la MPO dans le BALF est effectué selon la méthode **Bradly *et al.* (1982)**, avec quelques modifications : nous avons mélangé 100 µL de BALF avec 100 µL de tampon potassium phosphate (50 mM, pH 6,0) contenant 0,5% (m/v) de HTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide de Sigma- Life Sciences).

Le mélange obtenu est congelé-décongelé dans l'azote liquide puis broyé par vibrations ultrasoniques à l'aide d'un Vibra Cell TM 75043 (Bioblock Scientific, 750W puissance max) durant 3 cycles. L'homogénat obtenu est centrifugé pendant 15 min à 40 000 x g à 4°C. 100 µL de surnageant sont mélangé avec 2,9 mL de tampon phosphate (50 mM, pH 6,0) qui contient : 0,167 mg/mL d'O-dianisidine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) et 0,0005 % de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'absorbance est mesurée à  $\lambda = 460$  nm.

### **3-4- Dosage des protéines totales dans le BALF**

Les protéines totales ont été mesurées selon la méthode Bradford décrite précédemment.

## **Chapitre 4 : Evaluation de l'effet anti-tumoral *in vitro* des extraits aqueux, hydroalcoolique et organique**

Dans le but d'explorer davantage nos extraits et apprécier leur effet anti-métastatique probable, nous avons choisi pour cette partie deux types de cellules :

- des cellules adhérentes matricielles normales et tumorales,
- des cellules non adhérentes.

### **4-1- Matériels utilisés**

#### **4-1-1- Les lignées cellulaires**

Les lignées cellulaires utilisées dans l'étude *in vitro* ainsi que leurs caractéristiques sont représentées dans **le tableau 7**.

##### *Lignées liquide HUT-78 et SeAx*

Ces deux lignées tumorales ont été gracieusement offertes par le Dr Michel L (INSERM S 976, France) au laboratoire de dermatologie (Faculté de Médecine-Université de Reims-Champagne Ardenne URCA, France).

##### *Lignées adhérentes LLC-Mk2, Huh7, A549, K562*

Les lignées cellulaires LLC-MK2, Huh7, A549 et K562 appartiennent et ont été utilisées à l'Unité de Chimie des protéines (Faculté de Médecine, ULB, Bruxelles, Belgique).

#### **4-1-2- Les milieux de culture**

Dans nos expériences *in vitro*, nous avons utilisé deux types de milieux de cultures :

- le milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, USA) utilisé pour les lignées cellulaires non adhérentes (liquides) : HUT-78, SeAx et K562,
- le milieu de culture DMEM (Gibco, UK) utilisé pour les lignées cellulaires adhérentes (matricielles) : MK2, A549 et Huh7.

#### **4-1-3- Cytokines**

- CXCL10: Recombinant Human CXCL10/IP-10 (Protein-RandD systems-266-IP).
- IL-17: Recombinant Human IL-17/IL-17A-(RandD systems-317-ILB).

**4-1-4- Autres produits**

- FBS: Serum Bovine Fœtal (Gibco-10270-106 by Thermo).
- Bleu de trypan (0,4%, Gibco-15250061- ThermoFisher SCIENTIFIC).
- Hoechst 33342: Trihydrochloride, Trihydrate, 10 mg/mL Solution in Water-molecular probes, H3570).
- MTT: Sigma ALDRICH, USA

**Tableau 7 : Lignées cellulaires utilisées dans notre étude et leurs caractéristiques (2)**

<b>Lignée cellulaire</b>	<b>espèce</b>	<b>Propriétés</b>	<b>Type cellulaire-tissu</b>	<b>Pathologie</b>
<b>LLC-MK2</b>	<i>Macaca mulatta</i> , monkey, rhesus	adhérentes	Cellules épithéliales-rein	
<b>A549</b>	<i>Homo sapiens</i> , human	adhérentes	Cellules épithéliales-poumon	carcinome
<b>HUH7</b>	<i>Homo sapiens</i> , human	adhérentes	hépatocytes	carcinome
<b>K562</b>	<i>Homo sapiens</i> , human	suspension	Lymphoblaste-moelle osseuse	Leucémie myéloïde chronique
<b>Hut-78</b>	<i>Homo sapiens</i> , human	suspension	Lymphocyte T de la peau	Lymphome cutané-Syndrome Sézary
<b>SeAx</b>	<i>Homo sapiens</i> , human	suspension		Lymphome cutané-Syndrome Sézary

**4-2- Evaluation de l'effet antitumoral des extraits aqueux et hydroalcoolique contre des lignées tumorales de lymphomes cutanés : Hut-78 et SeAx (Mebirouk *et al.*, 2016)**

**4-2-1- Culture cellulaire**

HUT-78 et SeAx sont des cellules T de lymphome cutané (CTL). Les deux lignées tumorales ont été maintenues dans le milieu de culture RPMI 1640, suppl GlutaMAX (Gibco-61870044), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté à 56°C pendant 30 min et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans des plaques de culture de 24 puits à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO<sub>2</sub>, avec et concentration de 2 x 10<sup>5</sup> cellules/mL.

**4-2-2- Test de toxicité *in vitro***

Le test de cytotoxicité a été réalisé pour vérifier la capacité des deux extraits EA et EH à tuer les cellules cancéreuses. Afin d'évaluer le nombre des cellules mortes, ces dernières ont été colorées avec le bleu de trypan (0,2%) et comptées à l'aide d'un hématimètre. Les cellules colorées en bleues sont considérées non viables.

Le test de viabilité a été effectué comme suit : 250 µL de la suspension cellulaire des deux lignées tumorales avec une concentration de 2 millions cellules/ MI ont été incubées pendant 24 h avec les extrais EA et EH à différentes concentrations (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL et 50 µg/mL), lyophilisés et resuspendus dans le milieu de culture RPMI et dans une solution PBS respectivement. Les extraits ont été filtrés préalablement sur un filtre de 0,2 µm. Après 24 h d'incubation, nous avons récupéré 90 µL de chaque puits auquel on a ajouté 10 µL de bleu de trypan à une concentration de 0,2%. Après 2 min, le nombre de cellules totales ainsi que les cellules colorées en bleu a été compté, pour déterminer le pourcentage de mortalité cellulaire dans chaque condition en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de mort cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules bleues}}{\text{Nombre de cellules totales}} \times 100$$

### **4-2-3- Evaluation de la condensation de chromatine et la fragmentation nucléaire par le test Hoechst**

Afin de déterminer le type de mort cellulaire induite par EA dans les cellules cancéreuses, un test a été réalisé. Les cellules incubées avec l'extrait aqueux ont été colorées avec le colorant nucléaire appelé : hoechst 33342. C'est un fluorochrome qui se lie préférentiellement aux bases azotées A et T ; il permet de mettre en évidence la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire qui caractérisent les cellules apoptotiques.

La méthode de coloration est la suivante :

- après 24 h d'incubation des deux lignées Hut-78 et SeAx avec l'extrait aqueux à 50 µg/mL, 100 µL de chaque puits sont récupérés, centrifugés à 800 rpm pendant 10 min,
- le culot cellulaire est resuspendu dans 100 µL du réactifs Hoechst dilué (1:50 dans le milieu de culture RPMI 1640 avec 1% (m/v) d'antibiotiques),
- les noyaux cellulaires sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra et un ordinateur (Leica DM2500).

### **4-3- Evaluation de l'activité anti-proliférative des extraits hydroalcoolique et organique contre des lignées cellulaires normale et cancéreuses (MK2, A549, Huh7 et K562)**

Les deux extraits hydroalcoolique et organique sont testés pour leur effet anti-tumoral. L'extrait aqueux a été fractionné et testé pour son activité anti-tumorale contre les mêmes lignées cellulaires.

#### **4-3-1- Culture cellulaire**

Les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C, sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> et saturée en eau, dans des plaques de culture de 96 puits. Les milieux de culture utilisés sont le RPMI 1640 pour la lignée tumorale liquide K562 et DMEM pour les lignées matricielles MK2, A549 et HuH7. Les milieux sont enrichis avec 20% (v/v) de FBS et 1% (m/v) d'antibiotiques (Pénicilline et streptomycine). Le sérum a été préalablement décomplémenté pendant 1h à 56°C.

### 4-3-2- Test MTT

#### -Principe

La croissance cellulaire globale a été évaluée *in vitro*, au moyen du test colorimétrique MTT (3[4,5-diméthylthiazol-2yl] -bromure de diphenyltétrazolium). C'est un test mesurant la croissance d'une population cellulaire. Ce test d'évaluation de la prolifération cellulaire est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT, de couleur jaune, en son métabolite le bleu de formazan (de couleur violette). Le nombre de cellules vivantes après 72 h d'incubation est proportionnel à l'intensité de la coloration violette mesurée quantitativement par spectrophotométrie à  $\lambda=570$  nm.

#### -Protocole

Nous avons utilisé dans cette étude trois lignées matricielles ; une lignée normale non cancéreuse (MK2), deux lignées tumorales adhérentes (Huh7 et A549) et une lignée tumorale liquide (K562). Les lignées cellulaires ont été incubées pendant 24 h dans des plaques de 96 puits avec les deux extraits hydroalcoolique et organique. Les microplaques sont incubées pendant 24h dans un incubateur (Hera cell, ThermoFisher scientific) à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La densité optique est mesurée en utilisant un lecteur de microplaque (Molecular Devices Optimax) couplé à un ordinateur, à  $\lambda= 570$  nm. Chaque condition expérimentale a été analysée en quadruplicate.

#### - *Lignées tumorales adhérentes :*

Cent  $\mu$ L de la suspension cellulaire sontensemencés dans les microplaques. Après 24h d'incubation à 37°C, le milieu de culture est aspiré à l'aide d'un aspirateur (Integra vacusafe) et 100  $\mu$ L de chaque extrait est déposé dans chaque puits, puis les microplaques sont réincubées pendant 24h à 37°C. A la fin de l'incubation, nous avons rajouté 10  $\mu$ L du réactif MTT et on a ré-incubé les cellules pendant 4h. La réaction est stoppée avec l'ajout de 100  $\mu$ L de SDS à 10% (m/v).

#### - *Lignée tumorale liquide*

Cent  $\mu$ L de la suspension cellulaire sontensemencé avec 50  $\mu$ L de chaque extrait pendant 24h à 37°C. À la fin de l'incubation, 10  $\mu$ L de MTT sont rajoutés puis les microplaques sont ré-incubées 4h, à 37°C. La réaction est stoppée en utilisant 100  $\mu$ L de SDS à10% (m/v).

### **Chapitre 5 : Evaluation *in vitro* de l'effet anti-angiogénique des extraits**

L'activité anti-angiogénique des extraits aqueux et hydroalcoolique, a été évaluée sur les lignées Hut-78 et SeAx, en évaluant l'expression d'une protéase impliquée dans l'angiogénèse et l'invasion tumorale, la gélatinase MMP-9, par la technique de zymographie sur gel de polyacrylamide contenant 1% (m/v) de gélatine.

#### **5-1- Traitement des cellules**

Après avoir incubé les cellules cancéreuses avec les concentrations suivantes : 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL et 50 µg/mL des deux extraits EA et EH pendant 24 h, elles ont été récupérées puis centrifugées à 800 rpm pendant 10 min à 4°C. Les surnageants sont conservés à – 20 °C avant leur utilisation. Les surnageants des cellules non traitées sont considérés comme contrôle négatif. Nous avons également traité les deux lignées Hut-78 et SeAx avec deux cytokines, CXCL10 et l'IL-17, pendant 24h, avec les concentrations suivantes (CXCL10 : 500pg/mL et 1000pg/mL et IL-17 : 1ng/mL et 20ng/mL) et ces cellules sont considérées comme témoins positifs.

#### **5-2- Technique de zymographie**

Cette méthode repose dans un premier temps sur une séparation des protéines selon leur masse moléculaire par une technique classique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS à 10%. Ce type de zymographie permet en outre la révélation des gélatinases (MMP-2 et MMP-9). Dans ce cas, le gel de polyacrylamide est co-polymérisé avec un substrat protéique, la gélatine.

Les gels de polyacrylamide ont été préparés et conservés à 4°C 24h avant le dépôt (Annexes 2). 24µL de surnageants sont mis en suspension dans 6µL de tampon d'échantillon (2X), puis 28µL de nos échantillons sont déposés, dans chaque puits en duplicate. Après migration des échantillons (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Vertical Electrophoresis Cell, biorad). Après la migration, les gels sont lavés à température ambiante pendant 1 heure dans un bain de Triton X-100 à 2,5 %. Ils sont ensuite incubés pendant 18 heures à 37°C dans un tampon d'incubation (Annexes 2). Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie G-250, décolorés avec une solution de décoloration (Annexes 2), puis visualisés à l'aide d'un scanner de gel (Gel Doc XR+, Bio-Rad).

## **Chapitre 6 : Fractionnement de l'extrait protéique soluble de l'escargot *Helix aspersa* et évaluation des activités protéolytique et anti-proliférative des différentes fractions obtenues**

### **6-1- Extraction et précipitation des protéines solubles au sulfate d'ammonium**

Afin d'extraire les protéines solubles de la chair de l'escargot *Helix aspersa* et tester leurs effets anti-prolifératifs, une précipitation à 90 % de saturation en sulfate d'ammonium est réalisée. Elle est suivie d'une dialyse contre l'eau distillée (2x5L, 24h à 4° C). Pour cela, 9g de l'homogénat lyophilisé du pied d'*Helix aspersa* sont extraits à température ambiante pendant 2 h, dans 200 mL du tampon acétate de sodium (50 mM, pH 5,0), auquel on a rajouté une quantité de sulfate d'ammonium pour atteindre 90% de saturation (annexe 4). L'échantillon est soumis à une agitation rotative (Heidolph 2002) toute la nuit à 4 ° C, filtré sur papier wattman, puis centrifugé à 20 000 g (Beckman, modele L5-50 ultracentrifuge) pendant 30 min à 4 °C. Le filtrat constitue la fraction (F).

Le culot est solubilisé dans un volume minimum du tampon d'acétate de sodium (50 mM pH 5,0), homogénéisé pendant 1 h à température ambiante, filtré puis dialysé contre l'eau distillée ( 2x5L) pendant une nuit à 4°C L'échantillon obtenu est filtré ( $\emptyset = 0,2 \mu\text{m}$ ), concentré par vivaspin (15R, MWCO 5KDa) à diafiltration (Sigma sartorium 2-16K) puis filtré par le système millipore ( $\emptyset = 0,45 \mu\text{m}$ ). Cette fraction est appelée (C). La concentration en protéine dans les deux fractions **F** et **C** est estimée en mesurant la densité optique à  $\lambda=280 \text{ nm}$  à l'aide d'un système Nanovue (Healthcare 4282V2.04). L'échantillon est ensuite analysé par SDS-PAGE.

### **6-2- Fractionnement des protéines solubles par chromatographie échangeuse de cations en utilisant un appareillage chromatographique AKTA Start**

Le système AKTA Start (Healthcare) est équipé d'une colonne précoulée échangeuse d'anions Hi-Trap Q- Sepharose. La chromatographie échangeuse d'ions est basée sur les interactions des molécules en solution avec les ions de charge opposée de la phase stationnaire.

La colonne est préalablement équilibrée avec un tampon Tris-HCl (50mM, pH7,4, 5 volumes de colonne). Vingt cinq mL de l'extrait protéique C sont chargés sur la colonne de la colonne à un débit de 1 mL/min. Un lavage est réalisé avec le tampon d'équilibration. L'éluion des protéines est réalisée à l'aide d'un gradient de force ionique croissante allant de 0 à 1 M en

NaCl dans le tampon d'équilibration (20 volumes de colonne). Des fractions de 3 mL sont récoltées. Le profil chromatographique est obtenu par la lecture de l'absorbance à  $\lambda=280$  nm. Les fractions protéiques récupérées sont dialysées contre l'eau, concentrées par diafiltration et analysées par SDS-PAGE.

### **6-3- Séparation des protéines sur gel SDS-PAGE**

Une électrophorèse des extraits C et F ainsi que des fractions chromatographiques d'intérêt est réalisée en conditions dénaturantes sur gels polyacrylamide précoulés (ExcelGel, 245 x 110 x 0,5 mm, gradient 8-18 % en acrylamide) en utilisant le Kit Multiphore II de Amersham Biosciences. Les échantillons à analyser ont été réduits puis chauffés à 100°C pendant 5min, et finalement chargés sur le gel. La migration électrophorétique est effectuée pendant 80 min (600 V, 50 mA, 35 W) à  $15,0 \pm 0,1^\circ$  C, en utilisant un système horizontal (modèle Multiohore II de chez GE Healthcare), équipé d'un générateur de courant électrique et couplé à un cryostat (modèle Julabo F12). Un kit de marqueurs moléculaires est utilisé pour estimer les masses moléculaires des échantillons analysés (Bio-Rad US, PM compris entre 6,5-200 kDa). Le gel est ensuite coloré au nitrate d'argent (Dodeca™ silver stain kit, Biorad).

### **6-4- Evaluation de l'activité protéolytique de l'extrait C et des fractions chromatographiques**

Pour mettre en évidence la présence de protéases dans l'extrait protéique, l'activité enzymatique des extraits C ainsi que celle des différentes fractions obtenues par chromatographie est évaluée envers des substrats de synthèse couplés à des fluorophores : Z-Arg-Arg-7-Amido 4-methylcoumarin hydrochloride (Z-Arg-Arg-AMC), Z-Phe-Arg-AMC et Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (Sigma-Aldrich-Steinhein, Germany). Vingt  $\mu$ L de chaque fraction sont incubée avec 100  $\mu$ L de chaque substrat (50  $\mu$ g/mL) pendant 120 min à 37°C, dans un volume total de 3 mL de tampon phosphate (50mM, pH 6,8).

### **6-5- Identification des classes de protéases présentes dans l'extrait C et les fractions chromatographiques**

Afin de déterminer le type de protéases dans les fractions chromatographiques, deux types d'inhibiteurs sont utilisé: Pefabloc (1 mM, Roche, Mannheim, Germany) et Iodocetamide (5 mM). Cent  $\mu$ L de chaque échantillon ont été incubés avec 100  $\mu$ L d'inhibiteur et 1000  $\mu$ L de tampon phosphate (50 mM, pH 6,8), pendant 30 min à 37°C. Ensuite, nous avons rajouté au

milieu réactionnel 1700  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate et 100  $\mu\text{L}$  de substrat Z-Arg-Arg-AMC(50  $\mu\text{g/ml}$ ), celui-ci étant sélectionné car clivé avec une grande efficacité.

L'absorbance est mesurée à  $\lambda=440$  nm avec un fluorimètre (SHIMADZU, RF-5001PC) couplé à un PC et à un bain thermostatique.

### **6-6- Evaluation de l'activité anti-proliférative des extraits C et F et des différentes fractions chromatographiques**

L'effet anti-prolifératif des extraits C, F ainsi que leurs fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions est mesuré par le test MTT en utilisant les lignées cellulaires MK2, A549, Huh7 et K562 selon la méthode décrite précédemment.

#### **Analyse statistique**

Les données des études *in vivo* et *in vitro* ont été analysées à l'aide d'un logiciel de statistique (Statistical Package for Social Science, IBM, SPSS version 20). Les résultats ont été analysés par analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie u test Tukey pour des comparaisons multiples. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart type, avec un seuil de signification statistique fixé à 0,05.

# **IV- Résultats**

## **et**

# **Discussion**

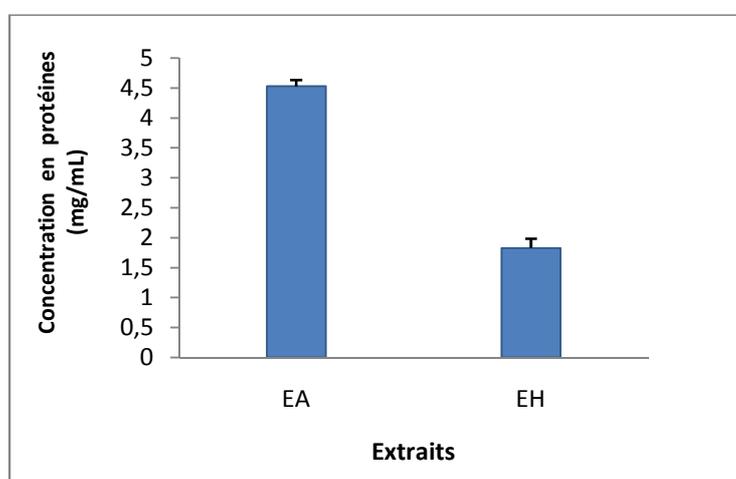
# 1- Résultats

### Chapitre 1 : Etude physico-chimique des extraits bruts : aqueux, hydroalcoolique et organique

#### 1-1- Dosage des protéines totales dans les deux extraits aqueux et hydroalcoolique :

Pour identifier les différentes substances chimiques présentes dans les différents extraits, un screening chimique a été réalisé. Il s'agit principalement de protéines et de polyphénols.

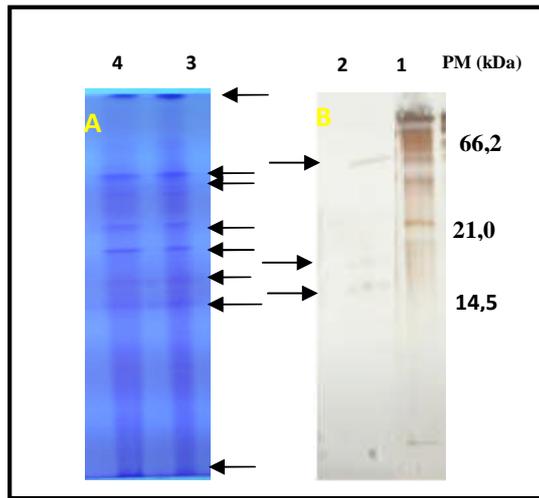
Le dosage des protéines totales contenues dans l'extrait aqueux (1 mg/mL) et hydroalcoolique (1 mg/mL) a été évalué en triplicate, par la méthode de Bradford. Les résultats montrent que 1 mg/mL de l'extrait aqueux contenait ( $4,53 \pm 0,48$  mg/mL) et l'extrait hydroalcoolique contenait ( $1,83 \pm 0,23$  mg/mL), (**Figure 25**).



**Figure 25** : Concentration en protéines totales dans les deux extraits d'*Helix aspersa*

#### 1-2- Estimation des protéines des extraits aqueux et hydroalcoolique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La présence de protéines dans les deux extraits EA et EH, a été confirmée par une électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Le profil électrophorétique montre plusieurs bandes protéiques de différents poids moléculaire dans les deux extraits (**Figure 26**).



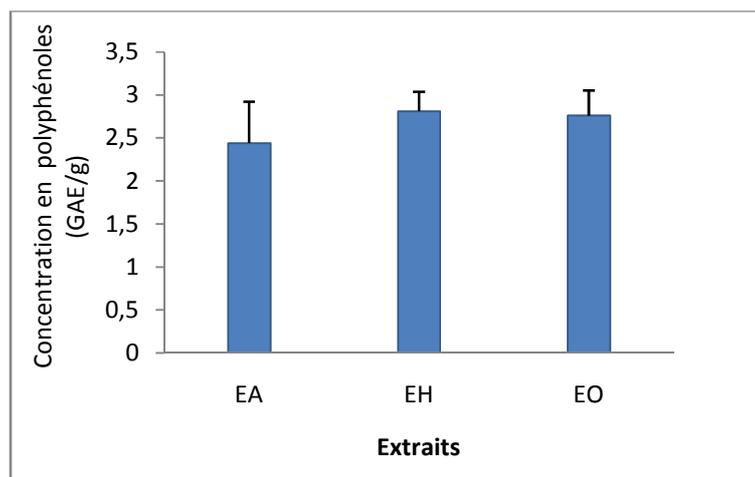
**Figure 26** : Profils électrophorétiques des deux extraits

(A : SDS-PAGE de l'extrait aqueux colorée au bleu de Coomassie, B : SDS PAGE de l'extrait hydroalcoolique colorée au nitrate d'argent).

1 : std, 2 : EH, 3 : EA, 4 : EA(duplicate)

### 1-3- Dosage des polyphénols totaux dans les trois extraits : aqueux, hydroalcoolique et organique

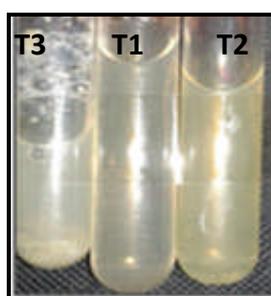
Dans une seconde étape, nous nous sommes intéressés à un autre type de molécules connues pour leurs activités biologiques (les polyphénols). La quantification des polyphénols totaux contenus dans chaque extrait a été réalisée par le réactif Folin-Ciocalteu en triplicate. Les résultats montrent que les extraits EA, EH et EO contiennent respectivement  $(2,443 \pm 0,11)$ ,  $(2,81 \pm 0,16)$  et  $(2,76 \pm 0,29)$  mg équivalent d'acide gallique/g (**Figure 27**).



**Figure 27**: Concentration en polyphénols dans les différents extraits de l'escargot *Helix aspersa*

### 1-4- Mise en évidence des flavonoïdes (Bouquet, 1972)

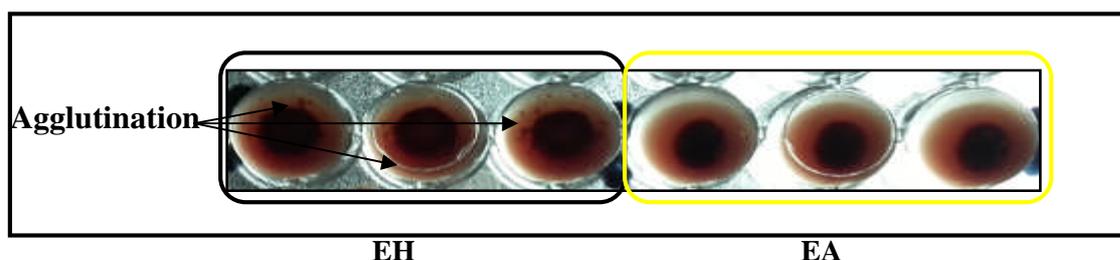
Les polyphénols regroupent un ensemble de substances chimiques, parmi lesquelles on a les flavonoïdes. La recherche des flavonoïdes dans la chair de l'escargot *Helix aspersa* se repose sur un test colorimétrique. En présence des flavonoïdes, les colorations suivantes : jaune-rougeâtre, rouge à rouge-violacé, rouge-foncé au violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées. Ces couleurs correspondent respectivement aux anthocyanes, flavones, flavonols, flavonones, isoflavones et leucoanthocyanes. Nous avons noté un changement de coloration dans les deux tubes qui contiennent l'extrait en présence de NaOH (T2) et l'extrait en présence de HCl et les copeaux de Mg (T3) quand ils sont comparés aux tubes témoins contenant l'extrait avec l'eau distillée (**Figure 28**). En effet, nous avons observé une coloration jaune dans les tubes ce qui indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait aqueux total de la chair d'escargot.



**Figure 28:** Résultats du test colorimétrique de la mise en évidence des flavonoïdes.

### 1-5- Mise en évidence de l'activité hémagglutinante des extraits aqueux et hydroalcoolique

Quant à l'activité hémagglutinante des extraits bruts (EA, EH et EO), elle était positive uniquement dans l'extrait hydroalcoolique. On a observé après 45 min d'incubation, une faible agglutination représentée dans la **Figure 29**.



**Figure 29:** Résultats du test d'hémagglutination des deux extraits aqueux et hydroalcoolique

## **Chapitre 2 : Effet protecteur *in vivo* de l'homogénat du pied d'escargot *Helix aspersa* contre l'hépatotoxicité induite par la cyclosporine A**

L'effet protecteur de l'homogénat du gastéropode a été évalué *in vivo* chez les rats ayant reçu un médicament immunosuppresseur connu pour ses effets hépatotoxiques. Dans cette partie, nous avons également réalisé un comptage des leucocytes ainsi que les lymphocytes et les granulocytes chez les animaux traités.

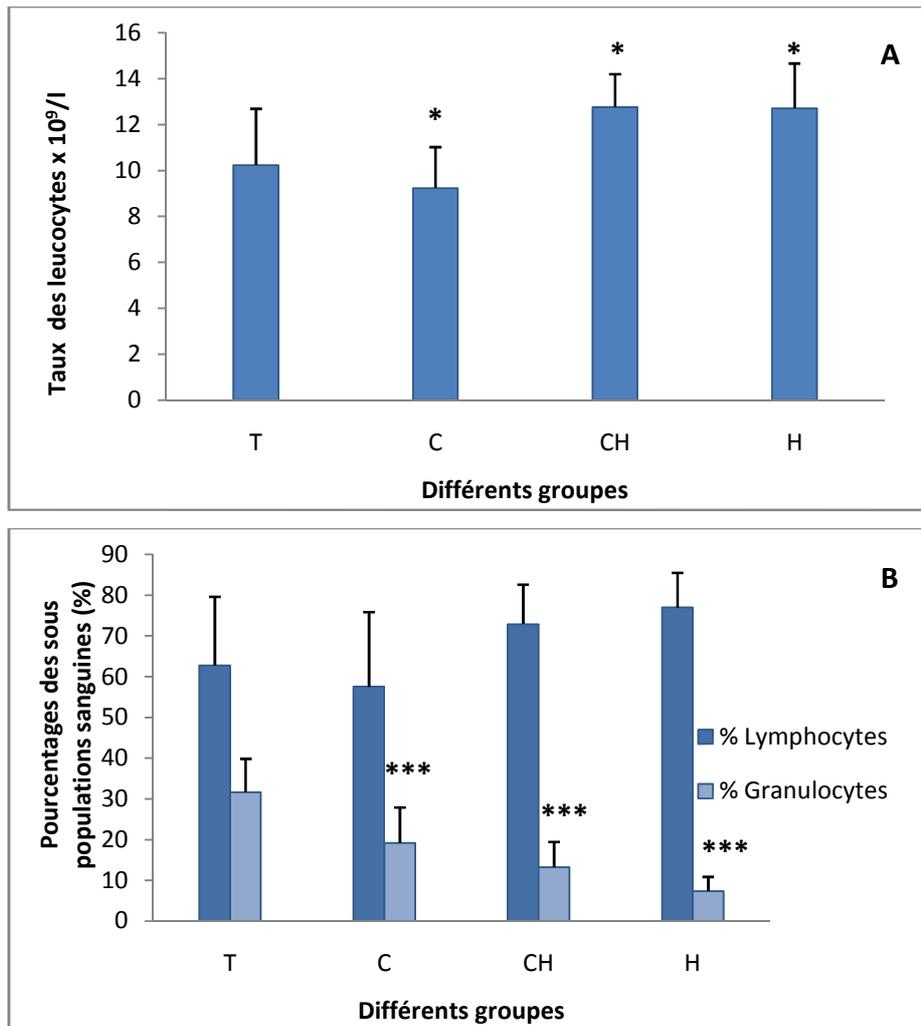
### **2-1- Effet de l'homogénat sur les différentes populations sanguines**

#### **2-1-1- Comptage des cellules sanguines (leucocytes, lymphocytes et granulocytes)**

Le résultat du comptage des leucocytes chez le lot traité par la cyclosporine A seule, a montré une diminution significative ( $p=0,02$ ) dans le taux de ces cellules. En effet, nous avons enregistré ( $9,22 \times 10^9 \pm 1,79$  cellules) par rapport au témoin ( $10,23 \times 10^9 \pm 2,44$  cellules). Cependant, chez les rats traités avec la cyclosporine A en présence de l'homogénat de l'escargot et avec l'homogénat seul nous avons noté une augmentation significative ( $p=0,02$ ) dans le taux des leucocytes ( $12,76 \times 10^9 \pm 1,42$ ) cellules et ( $12,7 \times 10^9 \pm 1,95$ ) cellules respectivement, par rapport aux témoins (**Figure 30-A**).

Le comptage de la sous-population lymphocytaire a montré une diminution non significative ( $p>0,05$ ) de ces cellules chez les rats traités par l'immunosuppresseur ( $57,56 \pm 18,27$ )% en comparaison avec les témoins non traités ( $62,78 \pm 16,86$ )%. Tandis que dans les deux autres groupes (CH) et (H), nous avons par contre remarqué une augmentation non significative ( $p>0,05$ ) par rapport au lot témoin : ( $72,88 \pm 9,74$ )% et ( $76,98 \pm 8,52$ )% (**Figure 30-B**).

En ce qui concerne la sous-population granulocytaire, nous avons remarqué une diminution très significative ( $p=0,00$ ) chez le lot traité par la cyclosporine A ( $19,2 \pm 8,72$ )%, le lot traité par la cyclosporine A et l'homogénat ( $13,22 \pm 6,20$ )% et par l'homogénat seul ( $7,34 \pm 3,53$ ) % en les comparant aux rats contrôles ( $31,66 \pm 8,2$ )% (**Figure 30-B**).



**Figure 30:** Effet de l'homogénat d'*Helix aspersa* sur le taux des différentes populations leucocytaires.

A : taux des leucocytes, B : pourcentage des sous-populations lymphocytaires et granulocytaires  
Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=5, \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 en comparaison avec le groupe contrôle.

### 2-1-2- Morphologie des cellules sanguines et leurs précurseurs médullaires

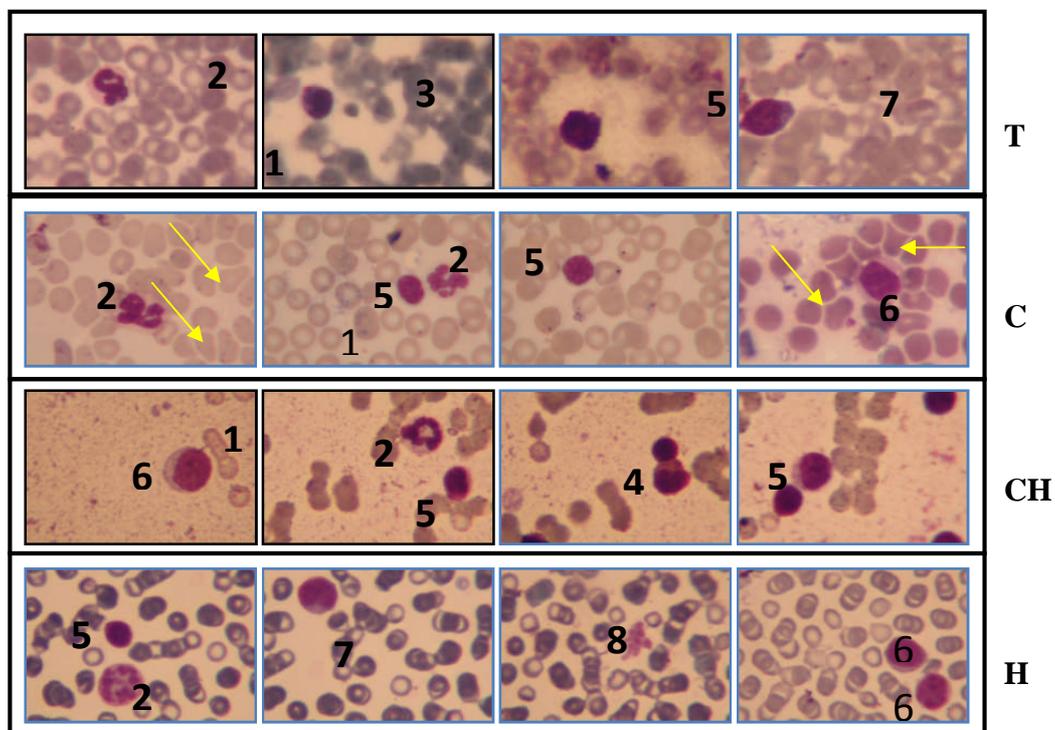
Dans le but de vérifier s'il y a eu un effet sur la morphologie des cellules, des frottis à partir du sang total et de la moelle osseuse ont été réalisés et colorés avec la technique May-Grunwald Giemsa.

L'observation microscopique des frottis périphériques des différents lots traités a montré que le frottis sanguin périphérique du lot traité par l'immunosuppresseur (lot C) était pauvre en leucocytes par rapport au lot témoin (**Figure 31**). En effet, nous avons observé quelques

neutrophiles (2), quelques petits lymphocytes (5) ainsi que de gros lymphocytes (6). Nous avons également remarqué une forme ovale des érythrocytes (1) (**flèche jaune, Figure 31**).

Dans le lot traité par la cyclosporine A en présence de l'homogénat (lot CH), nous avons constaté que le frottis sanguin périphérique était plus riche en cellules que celui du lot traité par la cyclosporine A seule. En effet, nous avons noté la présence de plusieurs petits lymphocytes (5) ainsi que de gros lymphocytes (6), des éosinophiles (4) et des neutrophiles (2). Les érythrocytes présentent une forme d'un érythrocyte normal (**Figure 31**).

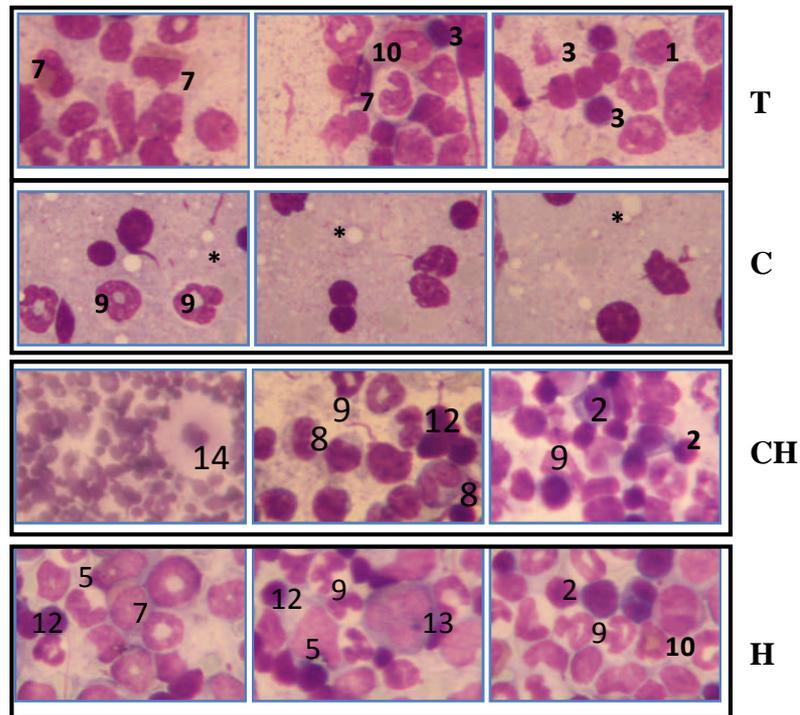
Dans le lot qui a reçu l'homogénat seul (lot H), nous avons remarqué la présence de plusieurs neutrophiles (2), de monocytes (7) ainsi que des plaquettes (8) (**Figure 31**).



**Figure 31** : Effet de l'homogénat d'*Helix aspersa* sur la morphologie des cellules du sang (colorées au May-Grunwald Giemsa-X400).

L'examen cytologique du frottis médullaire des différents lots traités a montré leur richesse en différentes populations médullaires. Dans le lot témoin, nous avons noté des proérythroblastes (1), des érythroblastes polychromatophiles (3), un myélocyte éosinophile et un myélocyte neutrophile (7), un éosinophile (10) (**figure 32**). Le frottis médullaire du lot traité par la cyclosporine A contient quelques neutrophiles (9) et des vésicules lipidiques (\*) (**figure 32**). Cependant, le lot traité par la cyclosporine A et l'homogénat est beaucoup plus riche que le lot C. En effet, nous avons noté la présence de mégacaryocytes (14) en plus de

précurseurs érythroïdes : érythroblastes basophiles (2) et myéloïdes : promyélocytes (6), métamyélocytes neutrophiles et basophiles (8), des lymphocytes (12) ainsi que des neutrophiles (9) (**figure 32**). Nous avons aussi remarqué la richesse du frottis médullaire du lot qui a reçu l'homogénat seul. En effet, nous avons noté la présence d'un promégacaryocyte (13), des lymphocytes (12), des neutrophiles (9), des myéloblastes (5), des érythroblastes basophiles (2), des myélocytes éosinophiles (7) ainsi que des éosinophiles (10) (**figure 32**).



**Figure 32** : Effet de l'homogénat d'*Helix aspersa* sur la morphologie des cellules médullaires (colorées au May-Grunwald Giemsa-X400).

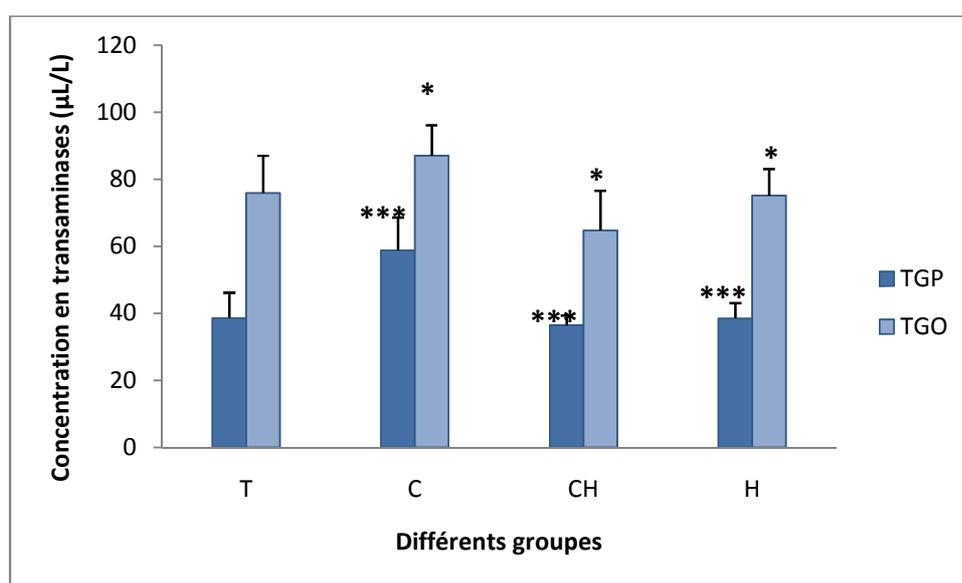
À la fin des traitements, l'effet de l'homogénat de la chair du mollusque *Helix aspersa* sur le système antioxydant des animaux a été évalué en dosant le taux des transaminases, du MDA hépatique, de la catalase et du glutathion réduit.

## **2-2- Effet de l'homogénat sur le statut oxydant et anti-oxydant**

### **2-2-1- Effet sur le taux des transaminases : ASAT (GTO) et ALAT (TGP)**

Le taux des transaminases (TGO et TGP) a été évalué dans le plasma des animaux traités. Les résultats ont montré une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) dans la concentration de la TGO dans le lot traité par la cyclosporine A seule ( $87,06 \pm 0,7$ )  $\mu\text{L/L}$  par rapport au lot témoin chez lequel la concentration de cette enzyme est ( $75,92 \pm 11,14$ )  $\mu\text{L/L}$ . Par ailleurs, les résultats montrent une diminution significative de cette enzyme ( $p < 0,05$ ) chez les rats qui ont reçu la

cyclosporine A accompagnée de l'homogénat ( $64,79 \pm 9,07$ )  $\mu\text{L/L}$  par rapport au lot C. Cependant, chez les rats qui ont reçu l'homogénat seul, la concentration de l'enzyme était proche de celle enregistrée chez le groupe témoin ( $75,14 \pm 7,14$ )  $\mu\text{L/L}$  (**Figure 33**). Concernant la TGP, nous avons observé une augmentation très significative ( $p=0,0$ ) de cette enzyme dans le lot traité à la cyclosporine A ( $58,82 \pm 9,79$ )  $\mu\text{L/L}$  par rapport au témoin ( $38,7 \pm 7,47$ )  $\mu\text{L/L}$ . Cependant, dans les lots traités par la cyclosporine A accompagnée par l'homogénat d'*Helix aspersa* et le groupe traité par l'homogénat seul, nous avons constaté une diminution très significative ( $p=0,0$ ) dans le taux de cette transaminase : ( $36,44 \pm 2,9$ ) et ( $38,46 \pm 4,58$ )  $\mu\text{L/L}$  respectivement par rapport au groupe C, (**Figure 33**).

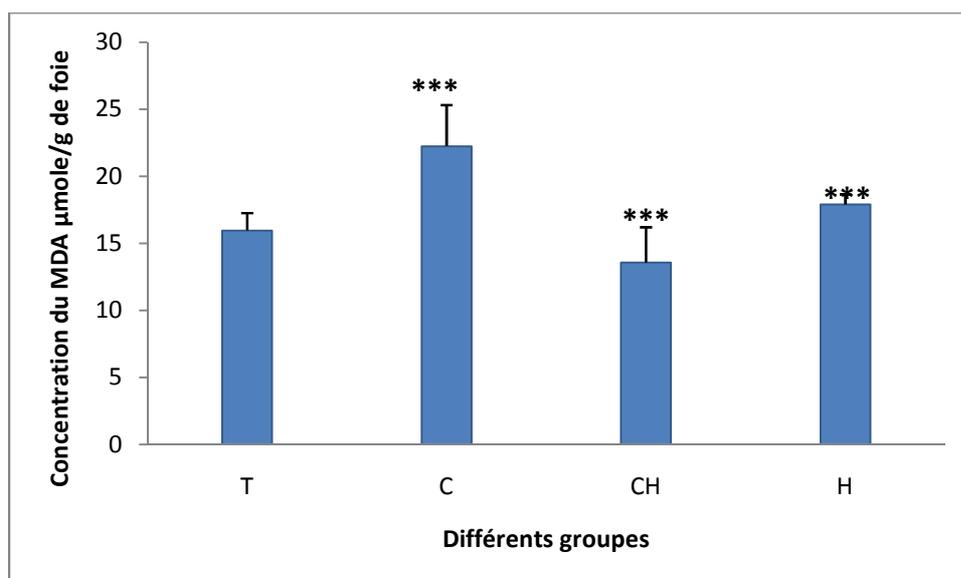


**Figure 33** : Effet de l'homogénat d'*Helix aspersa* sur le taux des transaminases.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=5$ , \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  en comparaison avec le groupe contrôle.

### 2-2-2- Effet sur le MDA

Le malondialdéhyde (MDA) est le produit de la peroxydation lipidique. Il a été dosé selon la méthode d'**Ohkawa et al., (1979)**. Les résultats montrent une augmentation très significative ( $p=0,00$ ) du taux du MDA dans le lot traité par la cyclosporine A ( $22,24 \pm 3,05$ )  $\mu\text{mole/g}$  de foie, en comparaison au lot témoin ( $15,96 \pm 1,29$ )  $\mu\text{mole/g}$ . Nous avons également remarqué une diminution très significative ( $p=0,00$ ) du taux du MDA chez les rats traités par la cyclosporine A avec l'homogénat ( $13,56 \pm 2,63$ )  $\mu\text{mole/g}$  de foie. Quant au lot qui a reçu l'homogénat seul, nous avons constaté une augmentation très significative ( $p=0,00$ ) de la concentration du MDA dans le foie ( $17,9 \pm 0,74$ )  $\mu\text{mole/g}$  de foie par rapport au groupe témoin (**Figure 34**).



**Figure 34 :** Effet de l'homogénat d'*Helix aspersa* sur le taux du MDA hépatique dans les différents groupes traités.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=5, \*\*\*P<0,001 en comparaison avec le groupe contrôle.

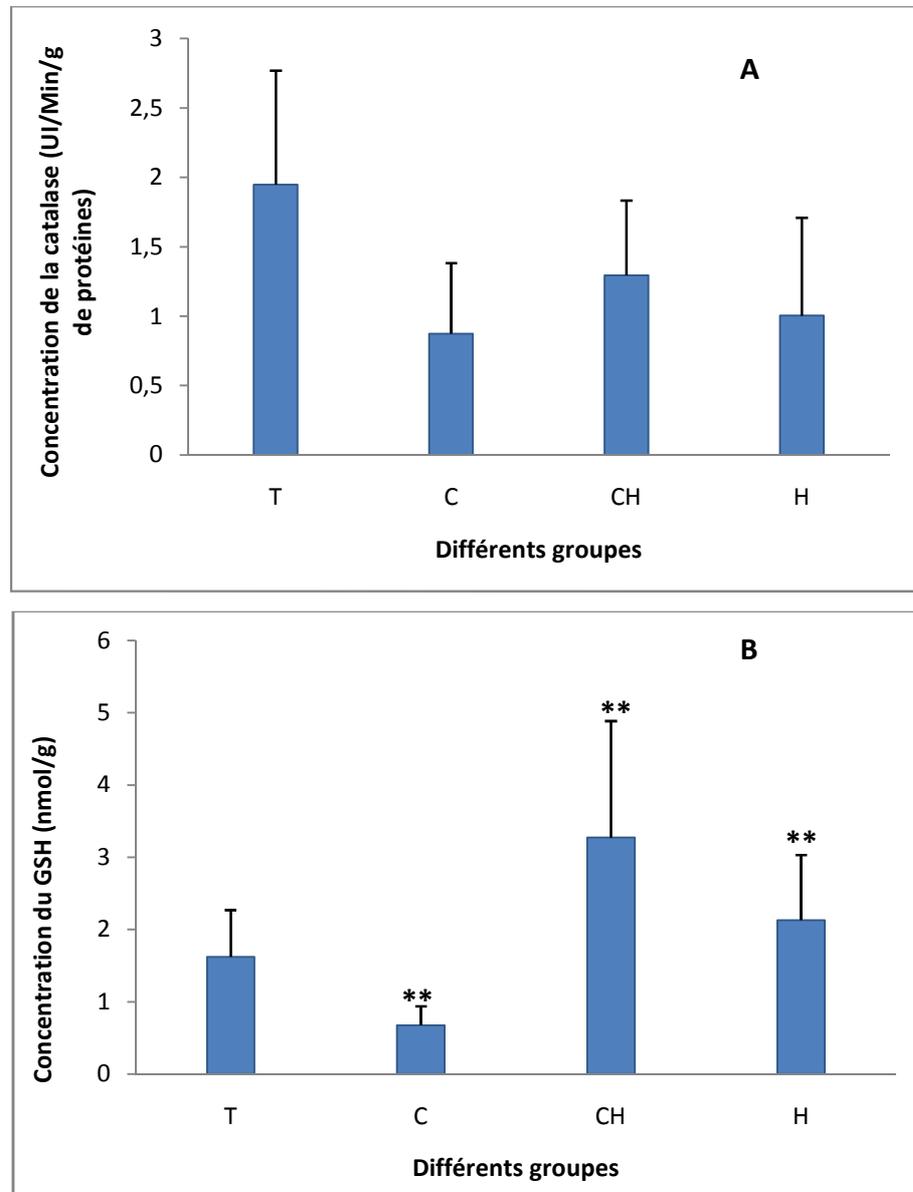
### 2-2-3- Effet sur l'activité enzymatique de la catalase

La catalase est une enzyme du système antioxydant de l'organisme. Son rôle est d'empêcher la formation des radicaux libres. Dans notre expérience, son activité a été dosée dans le foie des animaux traités selon la méthode élaborée par **Clairborne, (1985)**. Les résultats montrent une diminution non significative ( $p>0,05$ ) de l'activité de la catalase chez les rats traités par la cyclosporine A seule ( $0,87\pm 0,5$ ) UI/min/g de protéines. Nous avons également remarqué une augmentation non significative de son activité dans les deux groupes traités par la cyclosporine A en présence de l'homogénat et par l'homogénat seul respectivement ( $1,29\pm 0,54$ ) UI/min/g de protéines et ( $1,00\pm 0,7$ ) UI/min/g de protéines par rapport aux rats non traités ( $1,94\pm 0,82$ ) UI/min/g de protéines (**Figure 35-A**).

### 2-2-4- Effet sur le taux du GSH

Le dosage du GSH dans le foie des rats traités a été réalisé selon la méthode de **Beutler et al. (1963)**. Les résultats montrent une diminution très significative ( $p=0,006$ ) dans la concentration de la molécule chez le lot traité par la cyclosporine A ( $0,67\pm 0,26$ ) nmol/g, par rapport aux rats non traités ( $1,62\pm 0,64$  nmol/g). Cependant, nous avons enregistré une augmentation très significative ( $p=0,006$ ) dans le lot traité par la cyclosporine A en présence

de l'homogénat ( $3,27 \pm 1,61$ ) nmol/g et par l'homogénat seul ( $2,13 \pm 0,9$ ) nmol/g par rapport au lot témoin (**Figure 35-B**).



**Figure 35** : Effet de l'homogénat d'*Helix aspersa* sur quelques paramètres du système antioxydant.

A : Catalase. B : Glutathion réduit.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type, n=5, \*\*P<0,01 en comparaison avec le groupe contrôle.

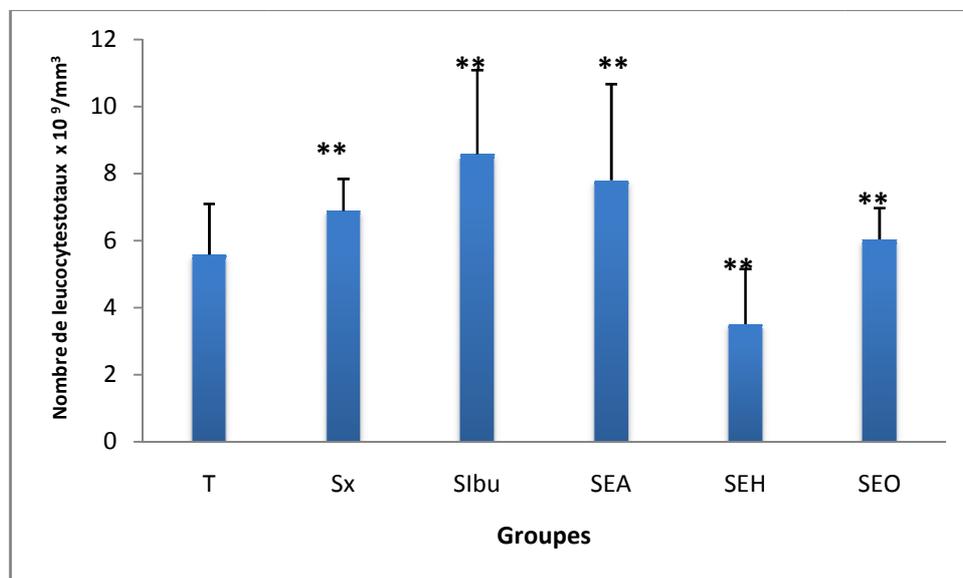
### Chapitre 3 : Effet anti-inflammatoire des trois extraits : aqueux, hydroalcoolique et organique

Dans le but de vérifier l'effet anti-inflammatoire *in vivo* des différents extraits de l'escargot *Helix aspersa*, un modèle de l'inflammation pulmonaire aigüe a été développé au laboratoire. Une dose de Séphadex de 1mg/mL a été instillée dans la trachée des animaux anesthésiés. Après 24h, le BALF, le sang ainsi que le poumon ont été prélevés.

#### 3-1- Effet des trois extraits sur le taux des leucocytes

##### a- Dans le sang

Le comptage cellulaire a montré une augmentation très significative ( $p=0,005$ ) dans le nombre de leucocytes dans le sang des lots Sx ( $6,8 \times 10^9 \pm 0,95$ ) cellules/mm<sup>3</sup>, SEA ( $7,8 \times 10^9 \pm 2,86$ ) cellules/mm<sup>3</sup> et SEO ( $6,02 \times 10^9 \pm 0,94$ ) cellules/mm<sup>3</sup>, et dans lot Sibü ( $8,58 \times 10^9 \pm 2,5$ ) cellules/mm<sup>3</sup> par rapport au témoin ( $5,58 \times 10^9 \pm 1,5$ ) cellules/mm<sup>3</sup>. Dans le lot SEH, au contraire, le nombre de leucocytes a été très significativement réduit ( $3,5 \times 10^9 \pm 1,64$ ,  $p=0,005$ ) cellules/mm<sup>3</sup> (**figure 36**).

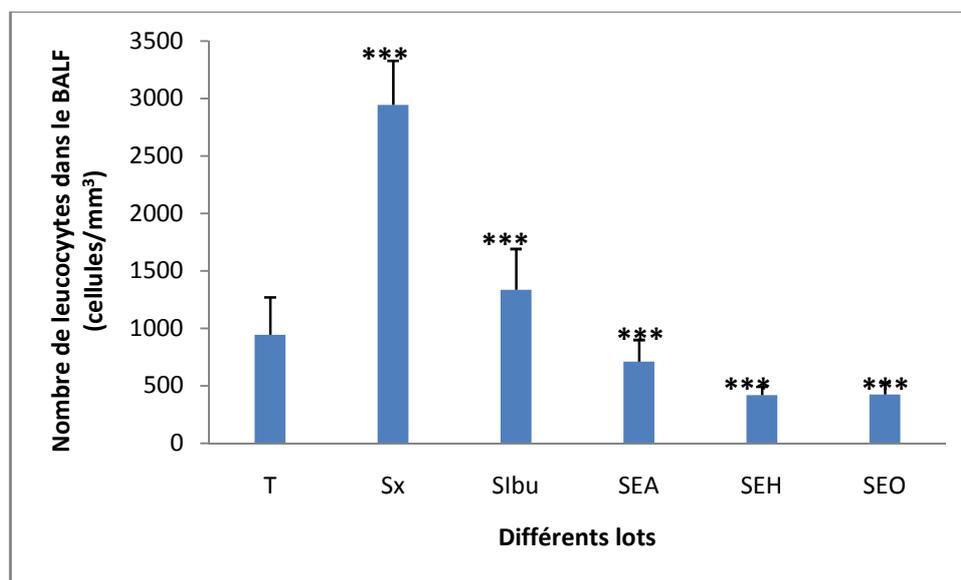


**Figure 36:** Effet des trois extraits d'*Helix aspersa* sur le nombre de leucocytes totaux. Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=5, \*\*\*P<0,01 en comparaison avec le groupe contrôle.

### b- Dans le liquide bronchoalvéolaire

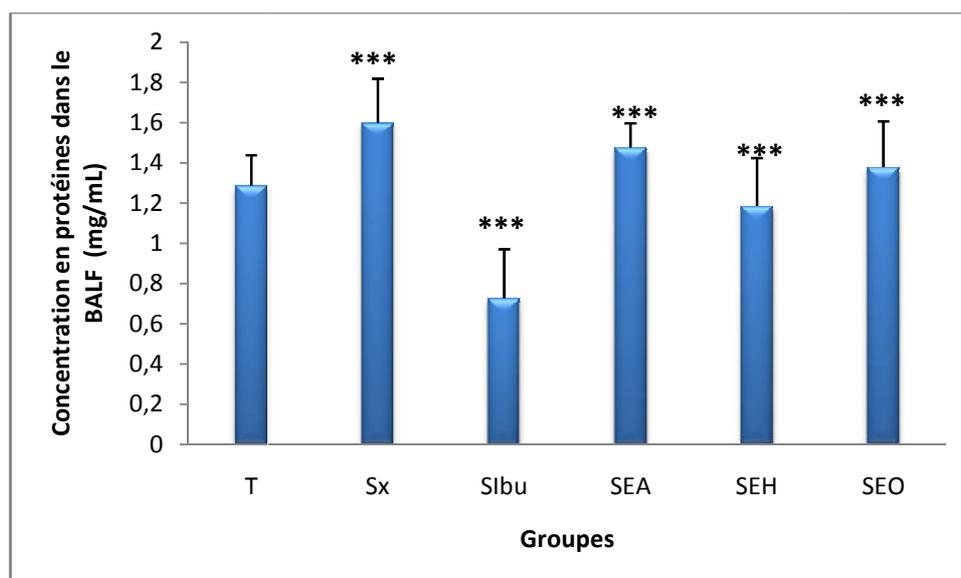
Les leucocytes du liquide broncho-alvéolaire ont été également dénombrés à l'aide d'un hématimètre. Les résultats obtenus montrent une augmentation très significative ( $p=0,00$ ) des leucocytes dans le lot traité par le Séphadex (Sx) ( $2944 \times 10^9 \pm 384,29$ ) cellules/mm<sup>3</sup> ainsi que dans le lot traité par l'anti-inflammatoire (SIbu) ( $1336 \times 10^9 \pm 353,94$ ) cellules/mm<sup>3</sup>. Cependant, nous avons enregistré une diminution très significative ( $p=0,00$ ) dans le nombre des leucocytes dans les autres lots traités par nos extraits : SEA ( $712 \times 10^9 \pm 186,33$ ) cellules/mm<sup>3</sup>, SEH ( $420 \times 10^9 \pm 71,06$ ) cellules/mm<sup>3</sup> et SEO ( $424 \times 10^9 \pm 104,3$ ) cellules/mm<sup>3</sup> par rapport au rats non traités ( $944 \times 10^9 \pm 324,46$ ) cellules/mm<sup>3</sup> (**Figure 37**).

Le dosage des protéines totales dans le BALF, a montré une augmentation très significative ( $p=0,00$ ) chez le lot Sx ( $1,59 \pm 0,22$ ) mg/mL par rapport au lot témoin ( $1,28 \pm 0,15$ ) mg/mL. En revanche, nous avons enregistré une diminution très significative ( $p=0,00$ ) de la concentration en protéines dans les lots traités par l'anti-inflammatoire après à l'instillation du Séphadex ( $0,72 \pm 0,24$ ) mg/mL et par les extraits aqueux ( $1,47 \pm 0,12$ ) mg/mL, hydroalcoolique ( $1,18 \pm 0,23$ ) mg/mL et organique ( $1,37 \pm 0,22$ ) mg/mL d'*Helix aspersa* par rapport au lot qui a reçu le Séphadex (**Figure 38**).



**Figure 37** : Effet des extraits d'*Helix aspersa* sur le taux des leucocytes dans le BALF

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=5, \*\*\*P<0,001 en comparaison avec le groupe contrôle.

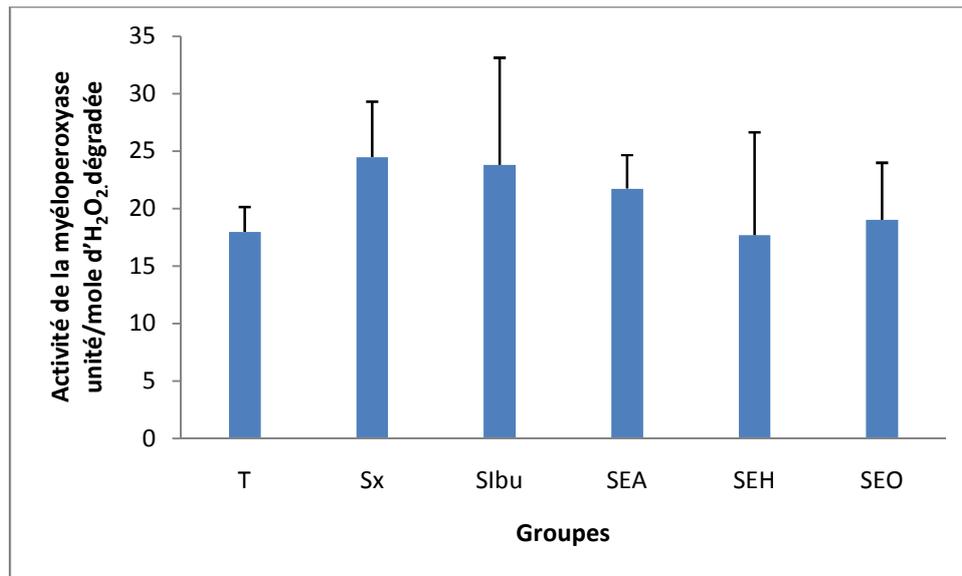


**Figure 38:** Effet des extraits d'*Helix aspersa* sur la concentration en protéines dans le BALF. Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=5, \*\*\*P<0,001 en comparaison avec le groupe contrôle.

### 3-2- Effet des trois extraits sur l'activité des neutrophiles pulmonaires

L'augmentation des leucocytes dans le BALF indique une activation de la réaction inflammatoire. En vue de comprendre le mécanisme d'action des extraits d'*Helix aspersa* dans le poumon, nous avons mesuré l'activation des principales cellules inflammatoires, à savoir les neutrophiles.

L'activation des neutrophiles dans le BALF a été évaluée par le dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO). Les résultats montrent une augmentation non significative ( $p>0,05$ ) de l'activité de l'enzyme dans le BALF du lot qui a reçu le Séphadex seul avec une concentration de  $(24,47 \pm 4,82)$  unité/mole d' $H_2O_2$  dégradée, par rapport au témoin  $(17,96 \pm 2,17)$  unité/mole d' $H_2O_2$  dégradée. Nous avons également remarqué une diminution non significative dans le lot traité par l'anti-inflammatoire après l'instillation du Séphadex avec un taux de  $(23,79 \pm 9,32)$  unité/mole d' $H_2O_2$  dégradée ainsi que dans les lots traités par les extraits d'*Helix aspersa* par rapport au lot Sx : dans le lot SEA nous avons enregistré  $(21,72 \pm 2,92)$  unité/mole d' $H_2O_2$  dégradée, dans le lot SEH  $(17,69 \pm 8,93)$  unité/mole d' $H_2O_2$  dégradée et dans le lot SEO  $(19,02 \pm 4,94)$  unité/mole d' $H_2O_2$  dégradée (**figure 39**).



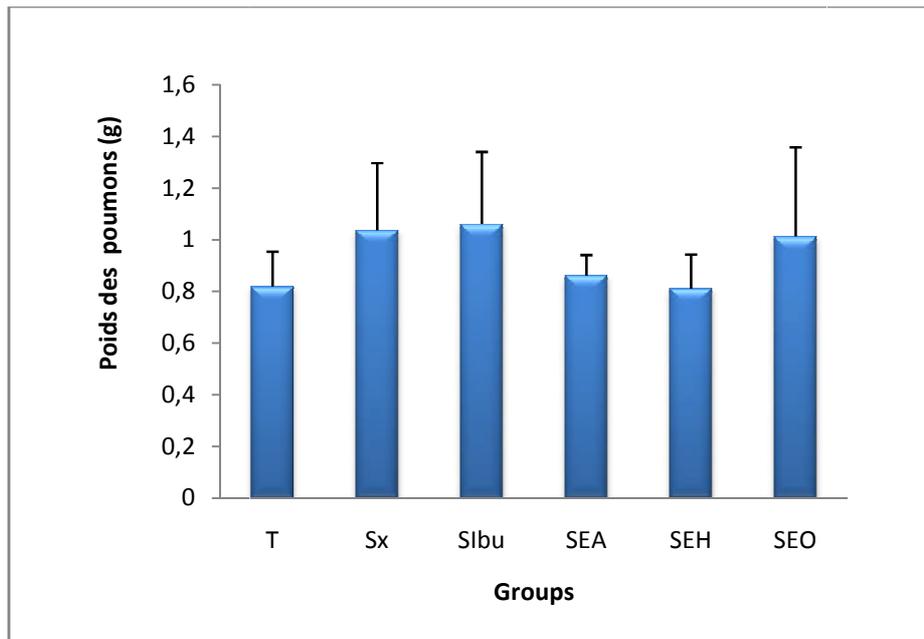
**Figure 39:** Effet des extraits d'*Helix aspersa* sur l'activité de la myéloperoxydase dans le BALF

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=5, P>0,05, en comparaison avec le groupe contrôle.

### 3-3-Effet des trois extraits sur le poumon

#### a- Sur le flux du fluide

Les poumons prélevés ont été pesés. Les résultats montrent une augmentation non significative ( $p>0,05$ ) dans le poids des poumons du lot qui a reçu le Séphadex seul ( $1,03\pm 0,27g$ ), le lot traité par l'anti-inflammatoire ( $1,06\pm 0,27g$ ) et le lot traité par l'extrait organique ( $1,01\pm 0,34g$ ) par rapport aux rats témoins ( $0,81\pm 0,13g$ ). Cependant, nous avons remarqué que le poids des poumons chez les lots traités par l'extrait aqueux ( $0,86\pm 0,07g$ ) et par l'extrait hydroalcoolique ( $0,81\pm 0,13g$ ) après l'instillation du Séphadex est le même que chez le lot témoin (**Figure 40**).



**Figure 40:** Effet des extraits d'*Helix aspersa* sur poids des poumons.

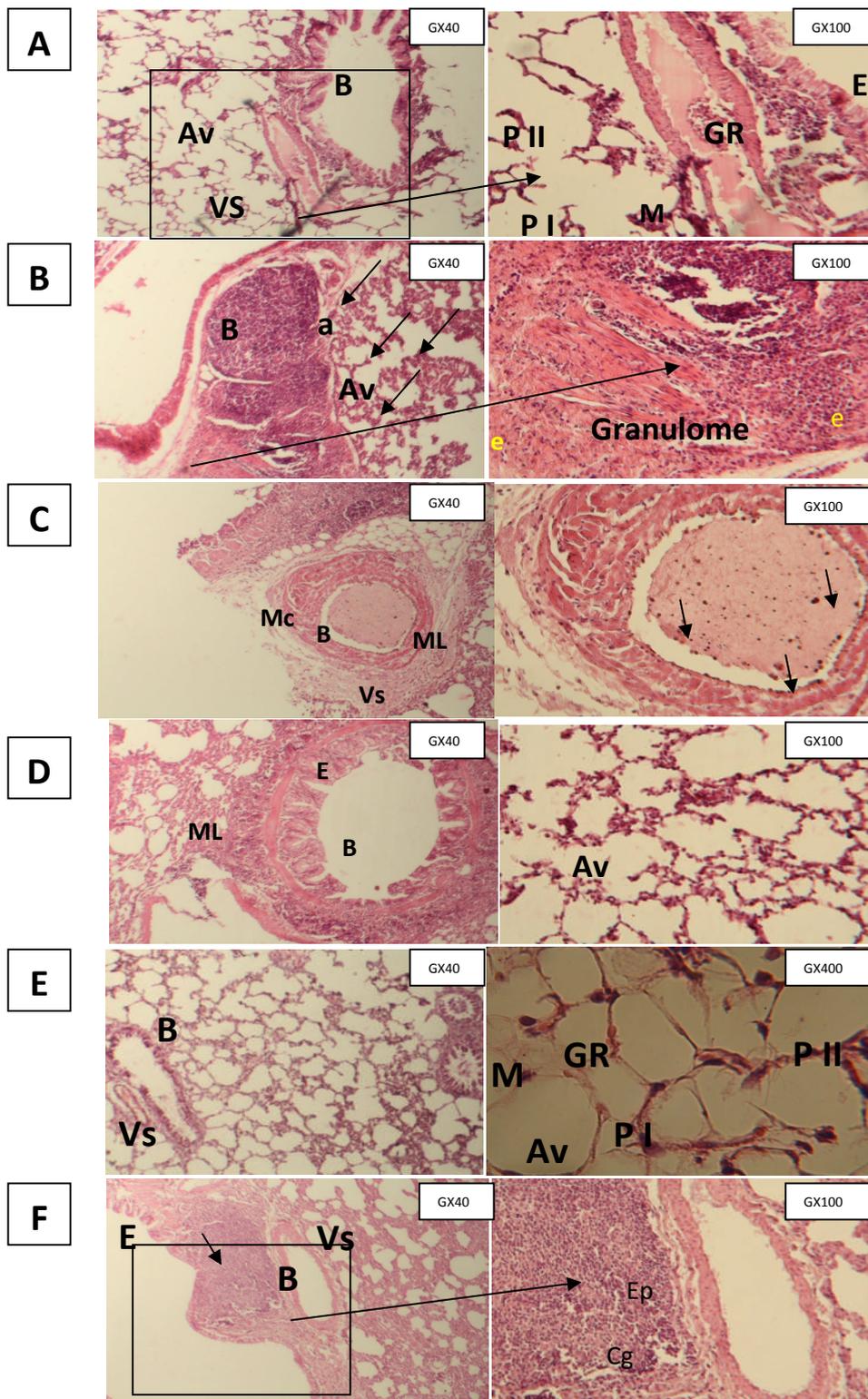
Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=5, P>0.05, en comparaison avec le groupe contrôle.

### b- Sur la structure pulmonaire

Afin de comprendre l'origine de l'augmentation du poids des poumons ainsi que l'effet des différents extraits préparés à partir du gastéropode *Helix aspersa* sur la structure du tissu pulmonaire, des coupes histologiques ont été réalisées. L'examen microscopique à faible grossissement (x40) du lot témoin a montré une architecture pulmonaire normale avec une bronchiole (B) dont l'épithélium (E) est normal, entouré d'un faisceau de muscle lisse (ML) (**Figure 41-A**). Au grossissement x100, nous avons pu identifier des macrophages (M), des pneumocytes de type I (P I) et de type II (P II) au niveau des alvéoles (Av) (**Figure 41-A**). Cependant, l'examen microscopique du lot qui a reçu le Séphadex par instillation intratrachéale a montré un poumon avec une structure altérée ; la paroi épithéliale est dégradée, nous avons remarqué la présence d'un granulome à proximité de la bronchiole. L'espace alvéolaire était infiltré par les leucocytes (flèche noire) (**figure 41-B**). Chez le lot traité par l'anti-inflammatoire, nous avons remarqué la présence du mucus dans la lumière de la bronchiole avec quelques cellules inflammatoires (flèches noires), et le parenchyme pulmonaire était altéré. En revanche, nous avons remarqué moins de cellules inflammatoires dans les alvéoles (**figure 41-C**). Quant au lot traité par l'extrait aqueux et le lot traité par l'extrait hydroalcoolique, nous avons remarqué moins de cellules inflammatoires dans l'espace alvéolaire et l'épithélium respiratoire est intact (**figure 41-D**, **figure 41-E**).

Concernant le dernier lot traité par l'extrait organique, nous avons observé un épithélium respiratoire normal. Cependant, nous avons constaté la présence de cellules inflammatoires et lymphocytes au voisinage des bronchioles. Ces cellules constituent le tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT) dans lequel nous avons identifié des cellules épithéliales (Ep), des éosinophiles (e) et des cellules géantes (Cg) (**figure 41-F**). Ces résultats confirment l'augmentation du poids du poumon dans le lot Sx, Sibu, et SEO et son diminution dans les lots SEA et SEH.

Le traitement par les trois extraits a entraîné une diminution des leucocytes dans le sang notamment le traitement par l'extrait hydroalcoolique et dans le BALF, a diminué la concentration des protéines dans le BALF et a réduit l'infiltration des cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire. Ces extraits semblent avoir une activité anti-inflammatoire.



**Figure 41** : Effets des extraits d'*Helix aspersa* sur l'histologie du poumon

Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine à différents grossissement.

A : lot T, B : lot Sx, C : lot Sibü, D : lot SEA, E: lot SEH, F: lot SEO.

Av: alvéole, B: bronchiole, Cp: cellule géante, E: epithelium respiratoire, e: éosinophile, Ep: cellule épithéliale, GR: globule rouge, M: macrophage, Mc: mucus, ML: cellules musculaires lisses, P I : pneumocytes type 1, P II: pneumocyte type 2, Vs: vaisseau sanguin, ↗ : infiltration leucocytaire.

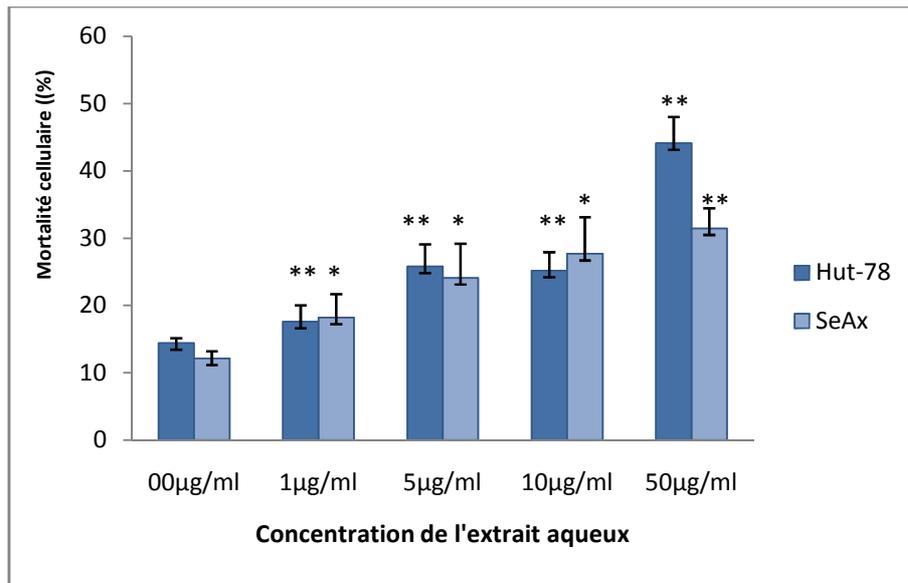
### Chapitre 4 : Effet anti-tumoral des trois extraits : aqueux, hydroalcoolique et organique

#### 4-1-Effet antitumoral des extraits aqueux et hydroalcoolique sur des lignées tumorales de lymphome cutané (HUT-78 et SeAx)

Le pourcentage de mortalité des cellules cancéreuses a été évalué en utilisant le bleu de trypan après une stimulation avec les extraits aqueux et hydroalcoolique pendant 24 h.

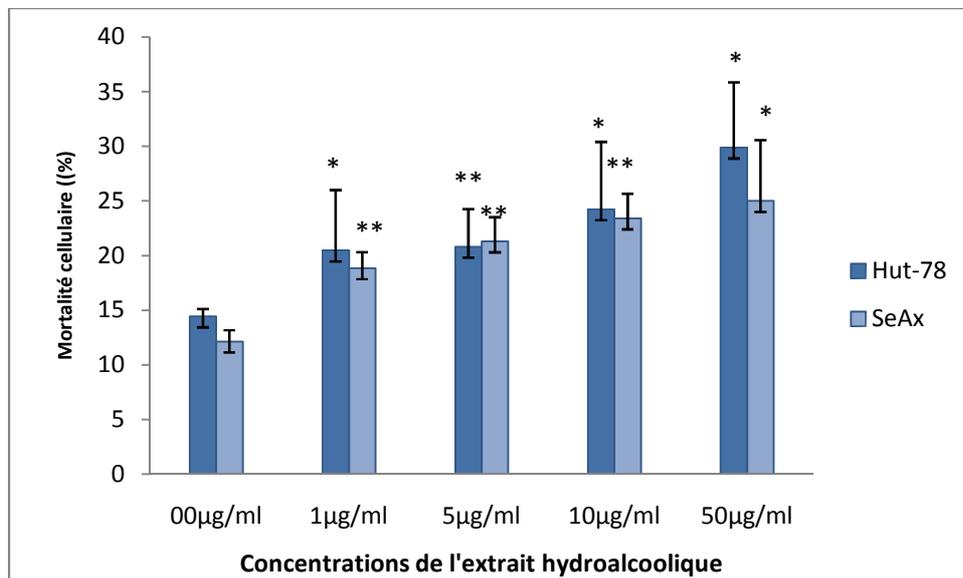
Le test de cytotoxicité a montré une augmentation du nombre des cellules mortes incubées avec l'extrait aqueux par rapport aux cellules non traitées de la lignée tumorale HUT-78 ( $14,44 \pm 0,69\%$ ), nous avons enregistré une augmentation dose dépendante très significative du pourcentage des cellules mortes incubées avec  $1 \mu\text{g/mL}$  ( $17,59 \pm 2,42\%$ ,  $p=0,006$ ), avec  $5 \mu\text{g/mL}$  ( $25,82 \pm 3,26\%$ ,  $p=0,005$ ), avec  $10 \mu\text{g/mL}$  ( $25,19 \pm 5,44\%$ ,  $p=0,004$ ) et avec  $50 \mu\text{g/mL}$  de l'extrait aqueux ( $44,09 \pm 3,89\%$ ,  $p=0,003$ ) (**Figure 42**), et une augmentation significative avec  $1 \mu\text{g/mL}$  ( $18,21 \pm 3,46\%$ ,  $p=0,012$ ), avec  $5 \mu\text{g/mL}$  ( $24,11 \pm 5,06\%$ ,  $p=0,014$ ), avec  $10 \mu\text{g/mL}$  ( $27,67 \pm 5,44\%$ ,  $p=0,013$ ), et une augmentation très significative avec  $50 \mu\text{g/mL}$  ( $31,47 \pm 2,96\%$ ,  $p=0,003$ ) dans la lignée tumorale SeAx par rapport aux cellules non traitées ( $12,14 \pm 1,05\%$ ) (**Figure 42**).

Le test de cytotoxicité a également montré une augmentation significative de la mortalité cellulaire vis-à-vis des deux lignées tumorales Hut-78 et SeAx après le traitement avec l'extrait hydroalcoolique. En effet, l'extrait hydroalcoolique a induit une augmentation dans la mortalité cellulaire dose dépendante: ( $20,47 \pm 5,53\%$ ,  $p=0,023$ ), ( $20,81 \pm 3,44\%$ ,  $p=0,009$ ), ( $24,24 \pm 6,17\%$ ,  $p=0,021$ ) et, ( $29,90 \pm 5,98\%$ ,  $p=0,013$ ), avec les concentrations de  $1 \mu\text{g/mL}$ ,  $5 \mu\text{g/mL}$ ,  $10 \mu\text{g/mL}$  et  $50 \mu\text{g/mL}$  pour la lignée Hut-78 par rapport aux cellules non traitées ( $14,44 \pm 0,69\%$ ) (**Figure 43**). Cependant, la mortalité cellulaire observe était de ( $18,84 \pm 1,47\%$ ,  $p=0,002$ ) avec  $1 \mu\text{g/mL}$ , ( $21,31 \pm 2,21\%$ ,  $p=0,004$ ) avec  $5 \mu\text{g/mL}$ , ( $23,41 \pm 2,25\%$ ,  $p=0,003$ ) avec  $10 \mu\text{g/mL}$  et ( $25 \pm 5,57\%$ ,  $p=0,016$ ) avec  $50 \mu\text{g/mL}$  en comparaison aux cellules non traitées de la lignée SeAx ( $12,14 \pm 1,05$ ) (**Figure 43**).



**Figure 42 :** Effet de l'extrait aqueux sur la mortalité des lignées tumorales Hut-78 et SeAx après 24h d'incubation

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=3 \*p<0,05, \*\*p<0,01 par rapport au contrôle.

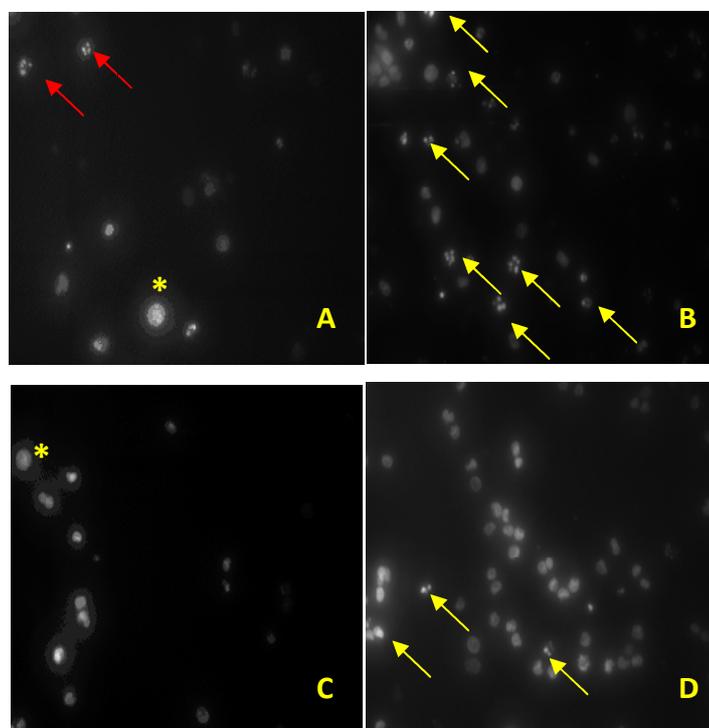


**Figure 43 :** Effet de l'extrait hydroalcoolique sur la mortalité des lignées tumorales Hut-78 et SeAx après 24h d'incubation

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=3 \*p<0,05, \*\*p<0,01 par rapport au contrôle.

### 4-2-Mode d'action de l'extrait aqueux sur les deux lignées Hut-78 et SeAx

Etant donné que l'extrait aqueux s'est avéré le plus toxique envers les lignées tumorales utilisées à la concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$  ; nous avons essayé de déterminer le mécanisme cellulaire exercé par cet extrait. Pour cela, un marquage nucléaire a été réalisé avec le colorant de l'ADN : le hoechst. L'observation par microscope à fluorescence des cellules tumorales a montré une fragmentation nucléaire caractérisée par une coloration brillante, ce qui indique une condensation de la chromatine (**flèches jaunes-figure 44 B/D**) en comparaison avec les cellules non traitées (**figure 44 A/C**) qui présentent une morphologie nucléaire normale et ne présentent pas de fluorescence (\*), à l'exception de quelques cellules (**flèches rouges-figure 44A**).

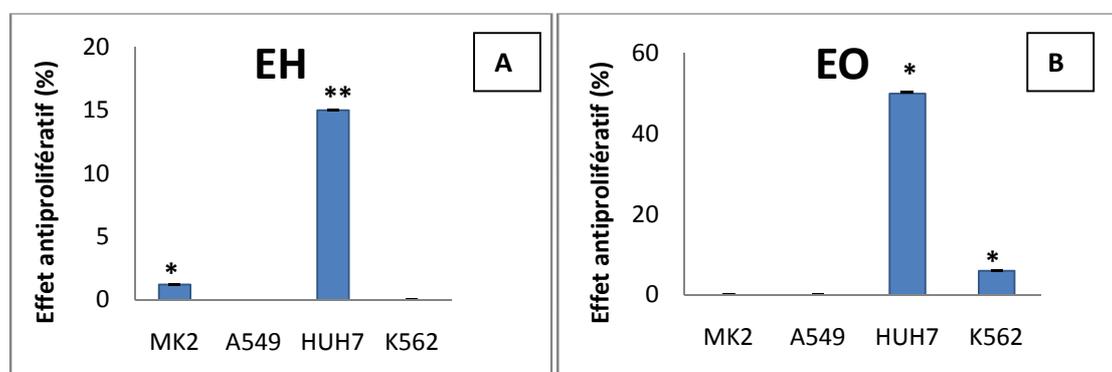


**Figure 44:** Marquage nucléaire par le colorant Hoechst des cellules tumorales incubées avec l'extrait aqueux.

A : Marquage nucléaire par le colorant hoechst des cellules tumorales HUT-78 en absence de l'extrait (contrôle), (B) : Marquage nucléaire par le hoechst des cellules tumorales HUT-78 incubées avec l'extrait aqueux à la concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Le pourcentage des cellules apoptotiques identifiées est d'environ 42 %, (C) : Marquage des noyaux par la coloration hoechst des cellules tumorales de la lignée SeAx sans l'extrait (contrôle). (D) : Marquage nucléaire par la coloration hoechst des cellules tumorales SeAx traitées avec l'extrait aqueux à 50  $\mu\text{g/mL}$ . La moyenne des cellules apoptotiques est d'environ 25%.

### 4-3- Effet anti-prolifératif des extraits hydroalcoolique et organique sur des lignées cellulaires normales et tumorales

L'effet antiprolifératif a été évalué par le test MTT, nous avons utilisé quatre lignées cellulaires. Une lignée normale (MK2) et trois lignées tumorales. Celles-ci sont une lignée matricielle de poumons (A549), une lignée matricielle d'hépatocytes (Huh-7) et une lignée liquide d'érythroblastes (K562). Les résultats montrent que les deux extraits n'ont aucun effet sur la lignée cellulaire normale MK2. Par ailleurs, chaque extrait présente un effet toxique envers la lignée tumorale Huh7. En effet, l'extrait hydroalcoolique a induit une inhibition de la croissance avec un pourcentage de ( $15 \pm 0,01\%$ ,  $p=0,008$ ), tandis que l'extrait organique a provoqué l'inhibition de 50 % de la population ( $50 \pm 0,29\%$ ,  $p=0,01$ ) (**figure 45**). En revanche, les deux extraits n'ont aucun effet sur la lignée tumorale A549.



**Figure 45 :** Effet anti-prolifératif des extraits hydroalcoolique et organique sur des lignées normale et tumorales.

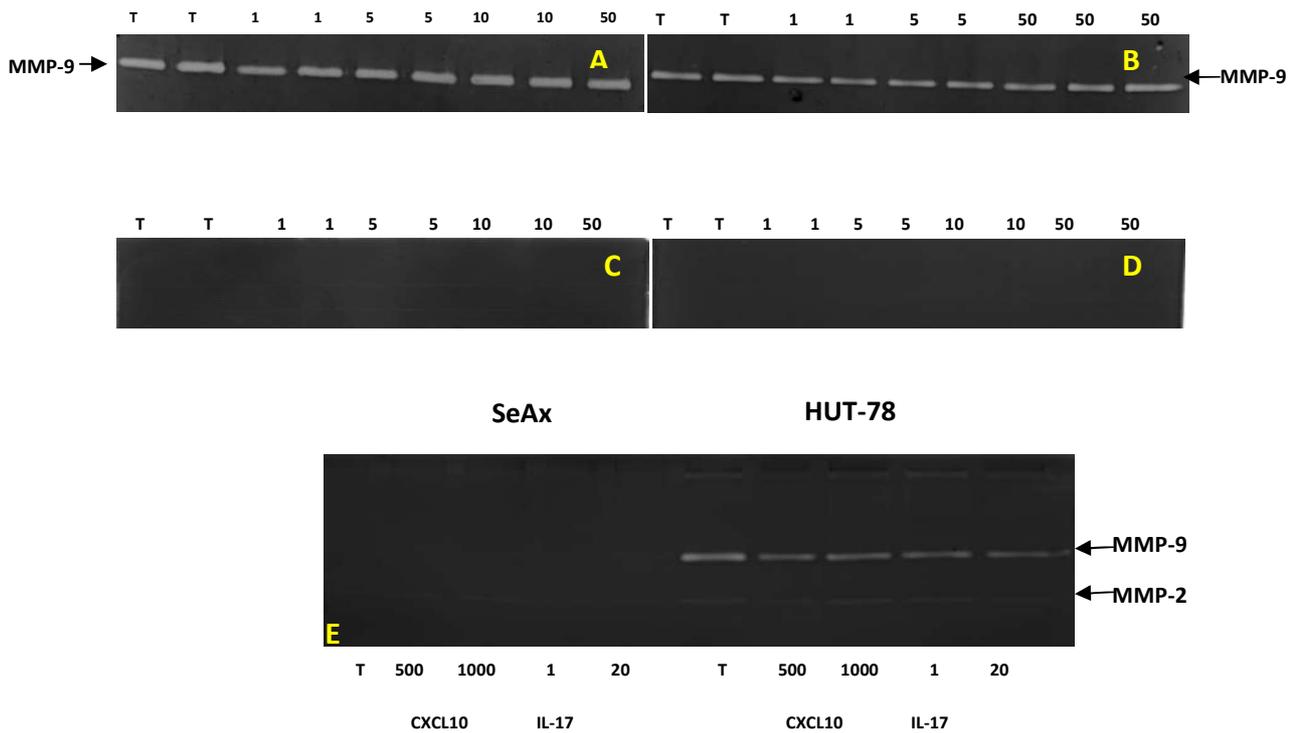
Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type,  $n=4$ ,  $*P<0,05$ , en comparaison avec le groupe contrôle.

Les trois extraits présentent une activité anti-proliférative envers deux parmi les trois lignées tumorales testées. Les extraits EH et EO n'ont aucune activité vis-à-vis la lignée cellulaire non tumorale utilisée dans ce test. L'extrait aqueux semble induire une apoptose dans les lignées tumorales du lymphome cutané.

### **Chapitre 5 : Effet antiangiogénique des deux extraits : aqueux, hydroalcoolique (l'expression de la MMP-9 dans des lignées de lymphome cutané)**

Pour vérifier si la fragmentation nucléaire et le changement de l'ADN sont associés à des modifications dans la sécrétion de la MMP-9, les cellules sont incubées avec les extraits du gastéropode (EA et EH) comme décrit ci-dessus. Les milieux de culture ont été récupérés après 24h d'incubation, pour tester l'activité de la MMP-9 par zymographie. Les zones blanches apparaissent et correspondent aux zones de l'activité lytique de la MMP-9 (**Figure 46**). L'analyse des gels a montré que la lignée tumorale HUT-78 exprime naturellement la protéase MMP-9 sous sa pro-forme inactive de 92 kDa, tandis qu'aucune activité de la protéase n'a été observé dans le milieu de culture de la lignée tumorale SeAx non traitée. En outre, pas de changement dans la production de la MMP-9 dans les deux lignées tumorales HUT-78 et SeAx traitées (**figure 46 A/B et 46C/D**).

Afin de confirmer l'absence d'effet antiangiogénique des deux extraits, nous avons analysé l'expression de la MMP-9 après un traitement avec deux cytokines utilisées comme contrôle positive : CXCL10 et IL-17. CXCL10 a induit une légère augmentation dans la production de la MMP-9 dans la lignée tumorale Hut-78. Cependant, l'effet de l'IL-17 a été plus prononcé dans ces cellules, ce qui suggère que la MMP-9 n'a pas été affecté par les extraits du gastéropode (**figure 46-E**). En effet, aucun des témoins positifs n'a été capable d'induire la sécrétion de la MMP-9 dans la lignée tumorale SeAx (**figure 46-E**), montrant que cette protéase n'est pas exprimée par ces cellules.



**Figure 46 :** Effet des extraits aqueux et hydroalcoolique sur la production de la MMP-9 par les lignées tumorales Hut-78 et SeAx en culture.

A: Puits 1-2: HUT-78 contrôle, puits 3-4: HUT-78 / EA 1 µg/ml, puits 5-6: HUT-78 / EA 5µg / ml. puits 7-8:HUT-78/EA 10µg / ml, puits 9-10: HUT-78/EA 50µg/ml. B:puits 1-2: HUT-78 contrôle, puits 3-4: HUT-78 / EH 1 µg/ml, puits 5-6: HUT-78 / EH 5µg / ml, puits 7-8-9: HUT-78 / EH 50µg / ml. C: puits 1-2: SeAx control, puits 3-4: SeAx / EA 1 µg/ml, puits 5-6: SeAx / EA 5µg / ml, puits 7-8: SeAx / EA 10µg/ml, puits 9-10: SeAx / EA 50µg/ml. D: puits 1-2: SeAx control, puits 3-4: SeAx / EH 1 µg/ml, puits 5-6: SeAx / EA 5 µg / ml. puits7-8: SeAx / EH 1 µg/ml, puits 9-10: SeAx/ EH 50 µg/ml. E: puits 1: SeAx Contrôle, puits 2: SeAx / CXCL10 (500 pg/ml), puits 3: SeAx / CXCL10 (1000Pg / ml), puits 4: SeAx / IL 17 (1 ng / ml), puits 5: SeAx / IL-17 (20ng / ml), puits 6: HUT-78 control, well 7: Hut-78 / CXCL10 (500 pg / ml), puits 8: HUT-78 / CXCL10 (1000pg / ml), puits 9: HUT-78 / IL-17 (1 ng / ml), puits 10: HUT-78 / IL-17 (20ng / ml).

### Chapitre 6 : Fractionnement de l'extrait protéique soluble de la chair de l'escargot *Helix aspersa* et évaluation de ses activités protéolytique et anti-proliférative

L'analyse des résultats *in vivo* et *in vitro* a montré que les trois extraits aqueux, hydroalcoolique et organique préparés à partir du pied du gastéropode *Helix aspersa* présentent plusieurs activités biologiques. Dans cette partie, nous avons essayé de purifier les protéines solubles à partir de la chair d'*Helix aspersa* en réalisant une précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions.

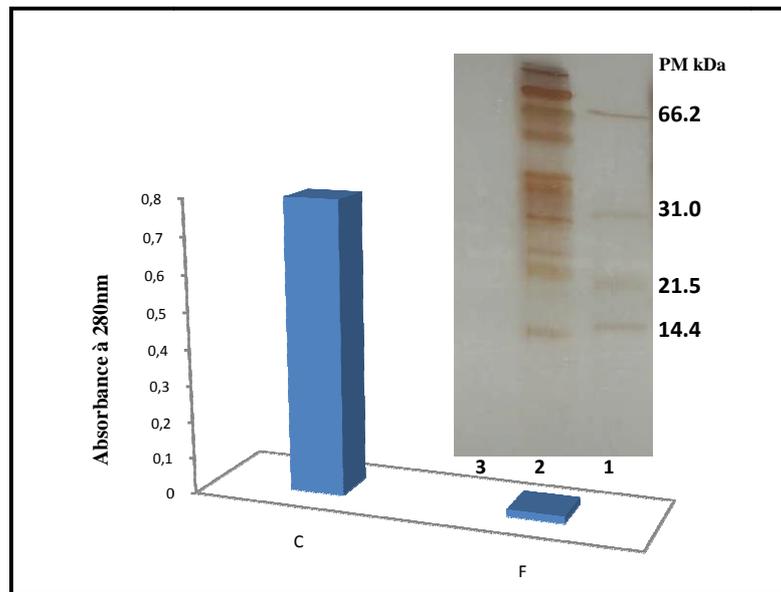
#### 6-1- Extraction et précipitation des protéines solubles au sulfate d'ammonium

L'étude des protéines est importante du fait de leur implication dans les différentes voies de signalisation de la cellule. Les protéines solubles ont été extraites et précipitées dans le tampon acétate de sodium à 90% de saturation en sulfate d'ammonium. Les deux fractions obtenues après l'extraction ont été nommées « C » pour culot et « F » pour filtrat. Nous avons mesuré la densité optique des deux fractions à  $\lambda=280$  nm. Les résultats montrent que l'extrait « C » a une  $D_{0,1}$  de 0,8. L'absorbance est par contre proche de zéro dans l'extrait « F » (**figure 47**). Nous avons également réalisé une SDS-PAGE sur les deux extraits. L'analyse des gels révèle l'absence de bandes protéiques dans le filtrat « F ». Cependant, le culot contient plusieurs bandes protéiques de différent poids moléculaires (flèche). Celles-ci pourraient correspondre à des protéines spécifiques de l'escargot *Helix aspersa* (**figure 47**).

#### 6-2- Fractionnement de l'extrait protéique sur la Q-sepharose

Dans la deuxième étape, le culot « C » a été fractionné sur une colonne échangeuse d'anions : Q-Sépharose. Les protéines sont alors éluées grâce à un gradient en NaCl de 0 à 1M dans le tampon Tris-HCl. La lecture de l'absorbance des différentes fractions collectées a été effectuée à  $\lambda=280$  nm. Le profil chromatographique a montré la présence de 3 pics protéiques majeurs : un pic constituant les fractions non retenues (FNR) et deux autres regroupant les fractions retenues FR1 et FR2. Les FNR, FR1 et FR2 ont été appelées respectivement P1, P2 et P3 (**figure 48**).

Le profil électrophorétique des différentes fractions a montré la présence de plusieurs bandes protéiques de différents poids moléculaires (**figure 48**). Les fractions P1 et P2 contiennent plusieurs bandes protéiques (flèche). La fraction P3 contient majoritairement trois bandes protéiques diffuses caractérisées par des PM apparents respectivement de 14,4 kDa, 31,0 kDa et >66,2 kDa (flèche).



**Figure 47 :** Mesure de l'absorbance des deux fractions C et F à  $\lambda=280\text{nm}$

SDS-PAGE colorée au nitrate d'argent des deux extraits C et F est également représenté dans la figure.

1: les marqueurs de taille, 2 : le culot et 3 : le filtrat.

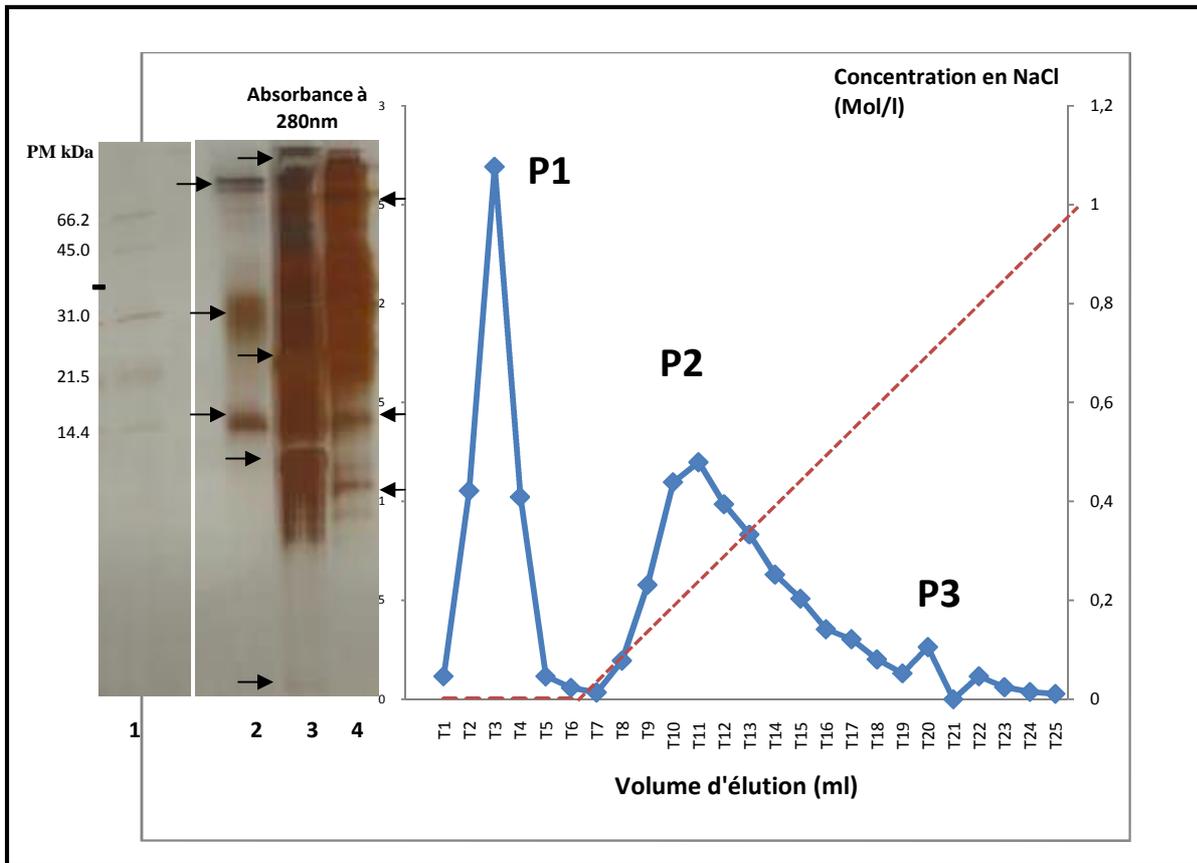


Figure 48 : Q-Sepharose FF de l'extrait « C ».

SDS-PAGE colorée au nitrate d'argent des fractions obtenues est également représenté dans la figure.

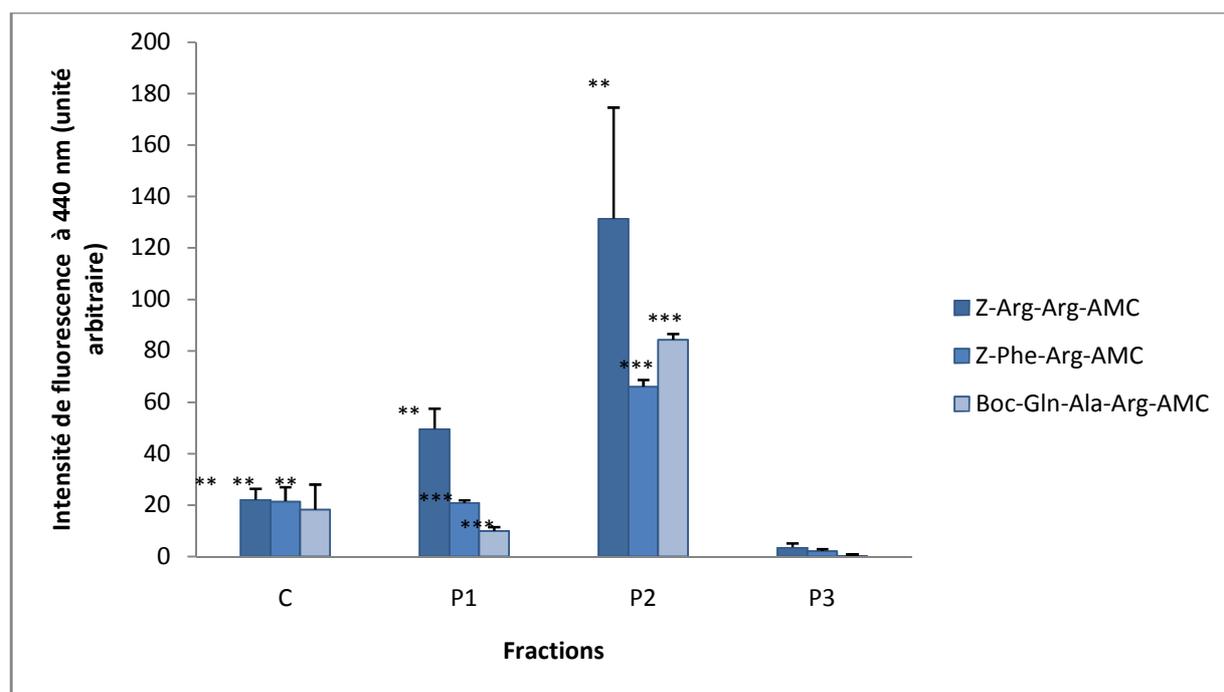
1: les marqueurs de taille, 2 : P3, 3 :P2 et 4 : P1.

### 6-3- Mise en évidence de l'activité protéolytique dans les fractions obtenues

L'activité enzymatique des extraits bruts « C » ainsi que des fractions fractionnées par chromatographie échangeuse d'anions (P1, P2 et P3) a été évalué en utilisant des substrats de synthèse : Z-Arg-Arg-AMC (Z-arg), Z-Phe-Arg-AMC (Z-phe) et Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (Boc-Arg). Les différentes fractions ont été incubées pendant 2h à 37° avec les substrats. La mesure de l'absorbance à 440 nm a été effectuée à l'aide d'un fluorimètre.

Les résultats ont montré une faible activité protéolytique de la fraction « C » et cela vis-à-vis des trois substrats utilisés. En effet, nous avons enregistré une intensité de fluorescence de ( $22,12 \pm 4,15$ ,  $p=0,003$ ) contre Z-arg, ( $21,4 \pm 5,48$ ,  $p=0,007$ ) contre Z-phe et ( $18,21 \pm 9,74$ ,  $p=0,01$ ) contre Boc-Arg. La même observation a été faite avec la fraction P1 (fraction non retenue de la chromatographie échangeuse d'anions de l'extrait brut C) avec une activité catalytique un peu plus élevée pour le substrat Z-arg ( $49,58 \pm 7,82$ ,  $p=0,004$ ). Nous avons enregistré une faible activité contre le substrat Z-phe ( $20,87 \pm 0,9$ ,  $p=0,00$ ) et une très faible activité vis-à-vis Boc-Arg ( $9,88 \pm 1,53$ ,  $p=0,001$ ), (**Figure 49**)

Une très forte activité protéolytique a été détectée avec la fraction P2 issue de la chromatographie échangeuse d'anions de l'extrait « C », envers le substrat : Z-arg avec une intensité de fluorescence de ( $131,36 \pm 43,18$ ,  $p=0,02$ ) tandis que nous avons noté ( $84,28 \pm 2,16$ ,  $p=0,00$ ) contre le substrat Boc-Arg et ( $66 \pm 2,61$ ,  $p=0,00$ ) contre le substrat Z-phe. En revanche, aucune activité protéolytique n'a été détecté dans la fraction P3 qui correspond à la deuxième fraction retenue de la chromatographie échangeuse d'anions de l'extrait « C », (**Figure 49**).



**Figure 49 :** Mesure de l'activité protéolytique des différentes fractions envers des substrats de synthèse.

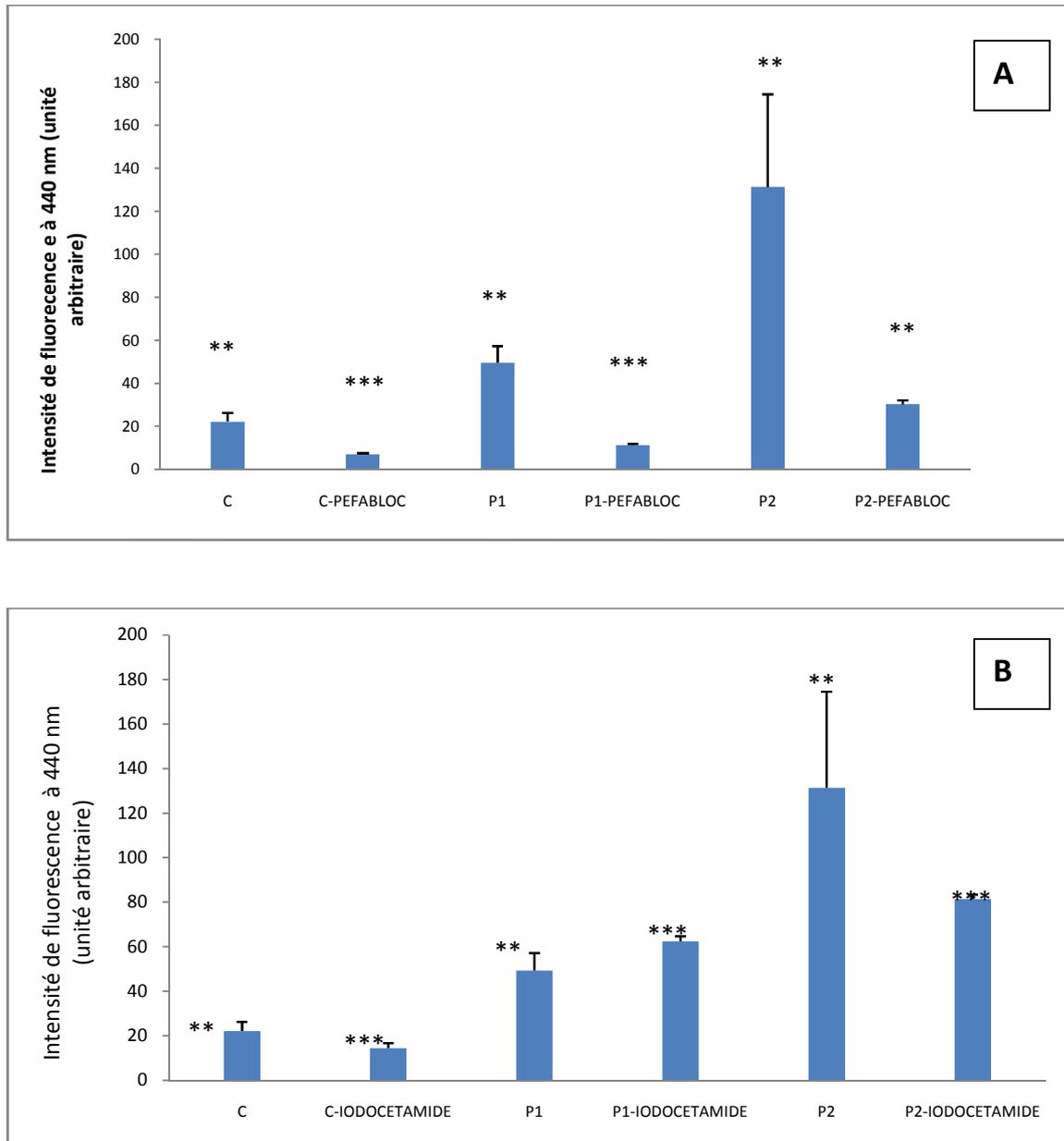
Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type, n=3, \*p<0,05, \*\*<0,01, p<0,001

#### 6-4- Identification des protéases dans les différentes fractions

Selon les résultats obtenus lors des mesures de l'activité protéolytique, l'extrait « C » ainsi que les fractions obtenues après la chromatographie sur Q-sepharose; ont une forte activité envers le substrat Z-Arg. En vue d'identifier le type de protéases, nous avons utilisé deux types d'inhibiteurs de protéases : le pefabloc ; un inhibiteur de protéase à sérine et l'iodocetamide, un inhibiteur de protéase à cystéine en utilisant le substrat Z-Arg-Arg-AMC.

Les résultats représentés, sur **la figure 51**, montrent une inhibition de l'activité enzymatique de l'extrait C en présence des deux inhibiteurs avec une intensité de fluorescence résiduelle de  $(7,02 \pm 0,35, p=0,00)$  avec l'inhibiteur pefabloc (**figure 50-A**) et  $(14,49 \pm 1,62, p=0,001)$  avec l'inhibiteur iodocétamide (**figure 50-B**), cela indique la présence de deux classes de protéases dans l'extrait brut : les protéases à sérine et à cystéine. De plus, l'activité enzymatique n'est pas totalement inhibée en présence d'un seul parmi les deux inhibiteurs. En revanche, l'activité enzymatique de la fraction P1 a été inhibée uniquement en présence du pefabloc (**figure 50-A**).

La fraction P2 semble contenir à la fois des protéases à sérine et à cystéine, avec une prédominance de l'activité protéase à sérine étant donné un effet inhibiteur plus marqué du pefabloc (**figure 50-A/B**).



**Figure 50 :** Mesure de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteurs (substrat Z-Arg-Arg-AMC)

A : en présence de pefabloc, B : en présence d'iodocétamide

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type, n=3 \*P<0,05

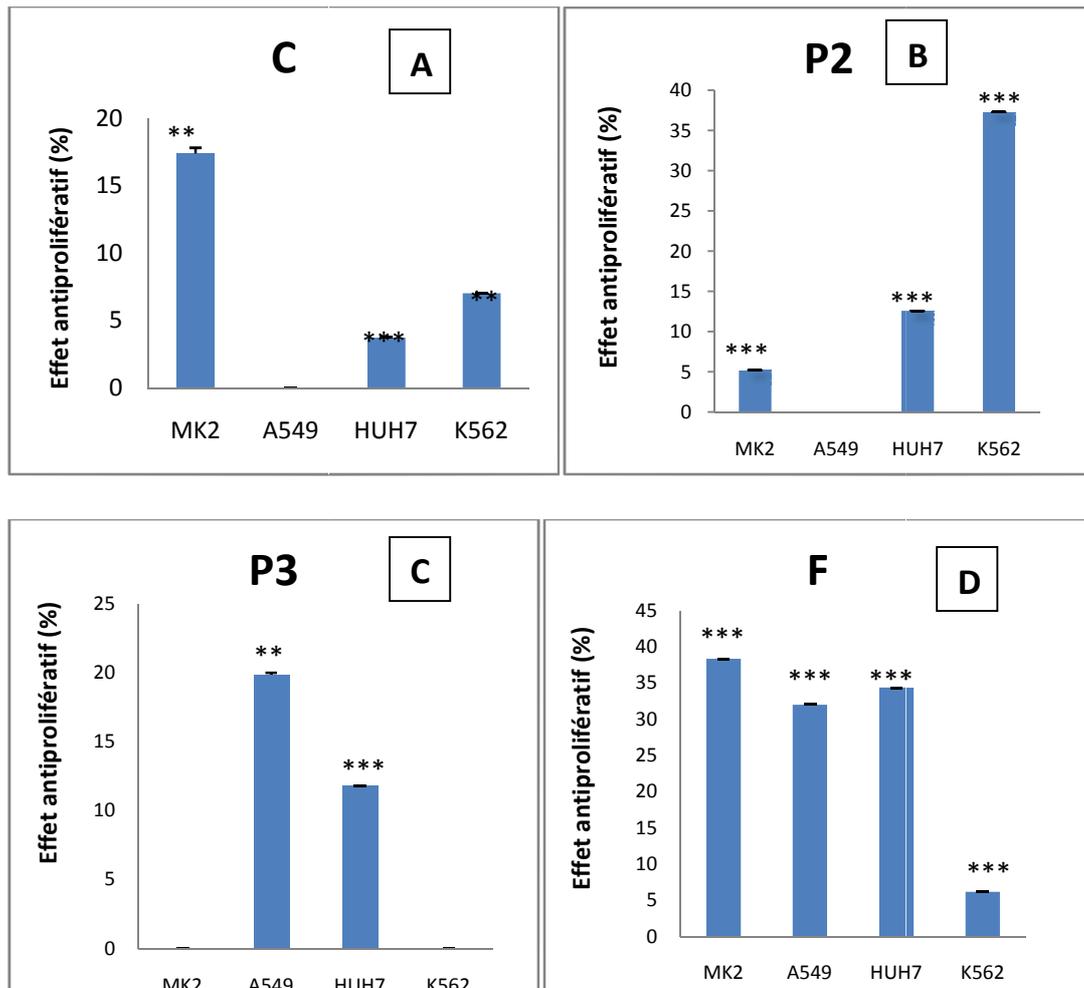
### 6-5- Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits et des fractions chromatographiques

L'effet antiprolifératif des extraits bruts (C et F) ainsi que des fractions obtenues après la chromatographie sur Q-Sepharose, a été évalué par le test MTT. Les résultats de cette étude montrent que quelques fractions présentent un effet antiprolifératif, d'autres au contraire ne sont pas toxiques. En effet, parmi les fractions testées, seulement les fractions C, P2, P3 et F montrent un effet antiprolifératif.

L'extrait protéique brut « C » obtenu après précipitation des protéines au sulfate d'ammonium a un effet toxique contre la lignée normale MK2 avec un pourcentage d'inhibition de  $(17,42 \pm 0,4\%, p=0,03)$  et seulement de  $(3,75 \pm 0,01\%, p=0,00)$  contre la lignée tumorale Huh7 et  $(7,03 \pm 0,25\%, p=0,042)$  contre la lignée tumorale K562 (**Figure 51-A**).

Les deux fractions retenues P2 et P3 issues de la chromatographie échangeuse d'anions de l'extrait C n'ont aucun effet antiprolifératif sur la lignée normale MK2. En revanche, ces deux fractions présentent un effet inhibiteur de la croissance tumorale de la lignée matricielle Huh7 avec un taux d'inhibition de  $(12,56 \pm 0,01\%, p=0,00)$  pour la P2 et  $(11,8 \pm 0,02\%, p=0,00)$  pour la fraction P3 (**Figure 51 B/C**). La fraction P2 s'avère très toxique contre la lignée liquide K562 avec un taux d'inhibition de croissance de  $(37,32 \pm 0,00\%, p=0,00)$  tandis qu'elle ne présente pas d'effet sur la lignée A549 (**Figure 51-B**). La fraction P3 a entraîné une inhibition de la prolifération de la lignée tumorale A549 avec un taux de  $(19,86 \pm 0,13\%, p=0,02)$  (**Figure 51-C**).

Quant à l'extrait brut F, on a enregistré une inhibition de la mortalité des différentes lignées matricielles y compris la lignée normale MK2, avec presque le même pourcentage d'inhibition. En effet, nous avons noté une inhibition de la croissance de  $(38,36 \pm 0,01\%, p=0,00)$  contre la lignée Mk2,  $(32,02 \pm 0,02\%, p=0,00)$  vis-à-vis la lignée A549 et de  $(34,36 \pm 0,01, p=0,00)$  contre la lignée tumorale Huh7. Par ailleurs, Cet extrait n'a aucun effet sur la lignée tumorale liquide K562. (**Figure 51-D**).



**Figure 51:** Activité antiproliférative des extraits bruts C et F ainsi que de quelques fractions obtenues sur Q-Sepharose.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart-type n=4, \*\*p<0,01,\*\*\*<0,001

Le fractionnement de l'extrait protéique sur la Q-Sepharose a donné 3 pics protéiques majeurs. Deux pics (P1 et P2) présentent une activité protéolytique et des effets toxiques contre quelques lignées tumorales. Le troisième pic (P3) ne présente aucune activité enzymatique mais est toxique envers d'autres lignées tumorales.

# 2- Discussion

Dans la présente étude nous avons essayé d'évaluer les effets biologiques de l'homogénat ainsi que trois extraits (extrait aqueux, extrait hydroalcoolique et extrait organique) préparés à partir de la chair d'un mollusque terrestre *Helix aspersa*. Nous avons également dosé deux types de molécules : les protéines et les polyphénols. Le dosage des protéines a montré la une forte teneur en protéines des deux extraits aqueux et hydroalcoolique. La présence de ces macromolécules dans la chair de l'escargot pourrait lui conférer une qualité nutritive très intéressante et pourrait présenter des effets thérapeutiques. La présence des protéines dans l'extrait hydroalcoolique a été confirmée par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'analyse du gel a révélé la présence de plusieurs bandes protéiques avec des tailles différentes. Les peptides de faible poids moléculaire sont connus pour leur implication dans la régulation des voies de biosignalisation. Cet extrait a également une faible activité hémagglutinante, ce qui indiquerait probablement la présence de lectines. Ce test n'est qu'une étude préliminaire, elle doit être confirmée par la purification et l'étude structurale des différentes lectines éventuelles de cette espèce.

L'activité hémagglutinante d'*Helix aspersa* a déjà été démontrée en 1971 (**Bizot, 1971**) dans un extrait de glande de l'albumen (une glande appartenant au système reproducteur de l'animal). En 2015, ces molécules ont été purifiées et caractérisées (**Pietrzyk et al., 2015**).

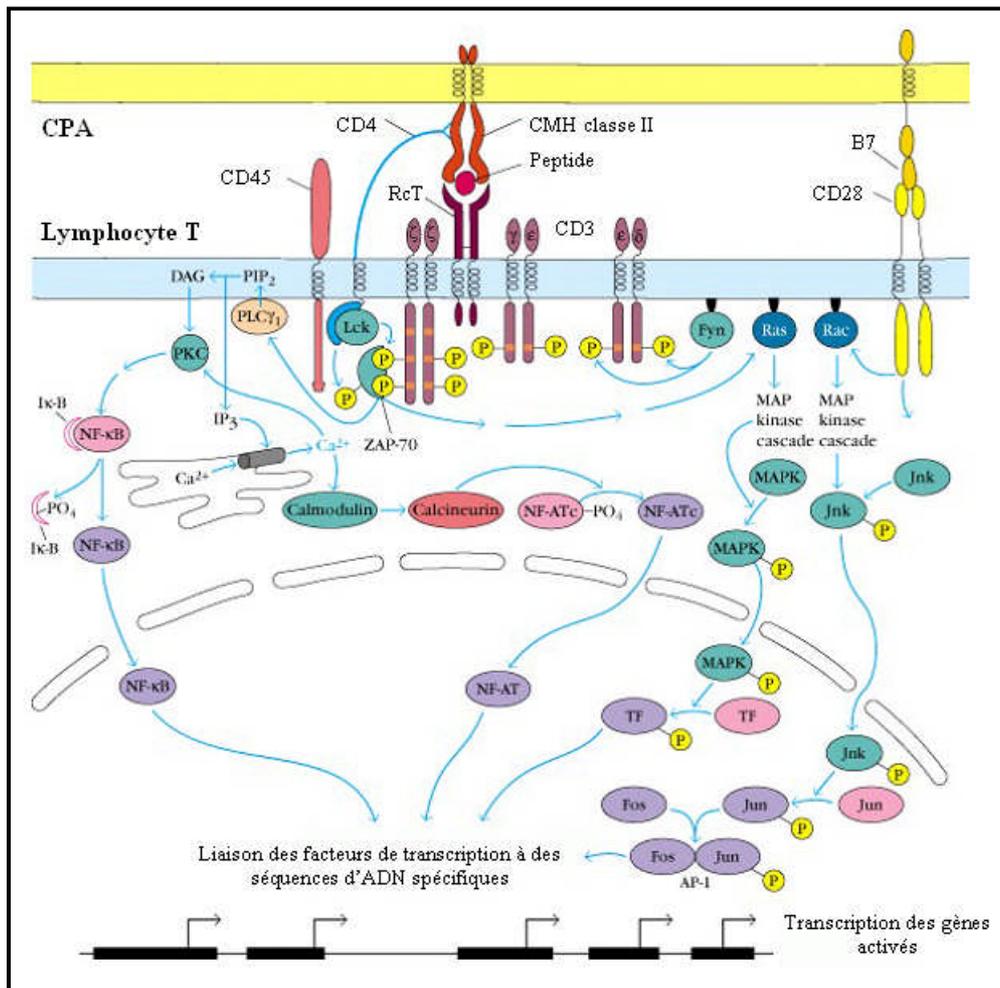
Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines qui ont une large distribution chez les animaux, les plantes et les microorganismes (**Zhang et al., 2009**). Chez les invertébrés terrestres ou marins, ces protéines font souvent partie d'un système d'immunité innée et présentent des spécificités pour les glucides présents à la surface des organismes pathogènes (**Vasta, 1992**). Des travaux se sont intéressés à l'étude des différentes activités biologiques des lectines. Plusieurs effets ont été démontrés : effet anti-inflammatoire, effet antiprolifératif, effet antitumorale et effet immunostimulant (**Zhang et al., 2009** ; **Bachelet, 2013**).

Le dosage des polyphénols par la technique du Folin Ciocalteu, a montré leur présence dans les trois extraits. A notre connaissance, aucun travail n'a encore évalué la présence de ces molécules dans les extraits du mollusque *Helix aspersa*. Les polyphénols et les flavonoïdes sont également connus pour leur activité antioxydante. Afin de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, nous avons réalisé un test colorimétrique. Le résultat a montré un changement de coloration vers le jaune en présence de HCl,  $Mg^{2+}$  et NaOH. Ce résultat indique la présence des flavonoïdes. Ce test n'est qu'une étude préliminaire, il doit être confirmé par la purification et la caractérisation des flavonoïdes par différentes techniques.

Afin de vérifier l'effet antioxydant *in vivo* du pied d'*Helix aspersa*, nous avons nourri des rats ayant reçu un immunosuppresseur (cyclosporine A), avec un homogénat du pied. La cyclosporine A est un médicament fréquemment utilisé lors de transplantations ainsi que pour le traitement des maladies auto-immunes, du fait de son action immunosuppressive potentielle et modulatrice de la réponse immunitaire (**Borel et al., 1996 ; Hagar, 2004 Benoit-Biancamano, 2009**).

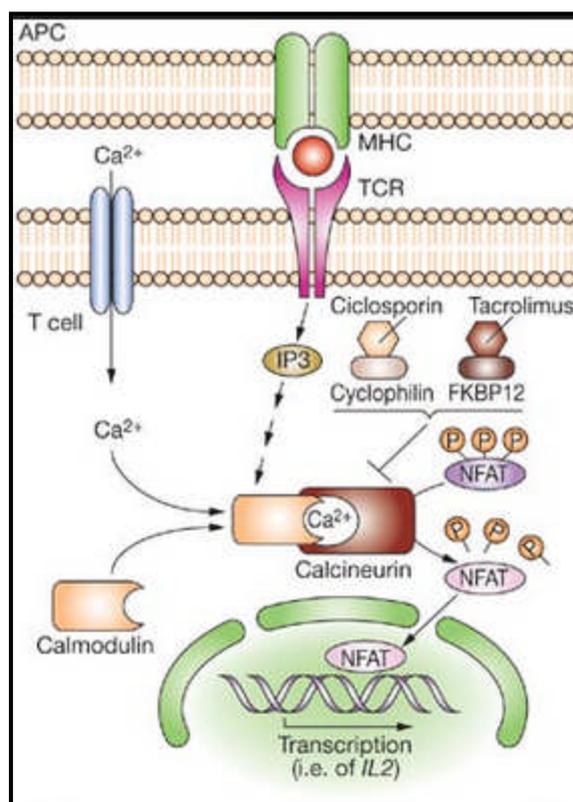
Les médicaments immunosuppresseurs agissent sur les cellules immunitaires à différents niveaux et cela dans le but d'empêcher le déroulement de la réponse immunitaire et prévenir le rejet de la greffe (**Stora, 2010**). Ces médicaments bloquent la prolifération lymphocytaire en inhibant un des signaux activateurs. La cyclosporine A est sélective pour les lymphocytes T helper (LTh) en inhibant la voie de signalisation qui active la synthèse de l'IL-2 (**figure 52**), inhibant par conséquent à la fois l'immunité cellulaire et humorale (**Khalil, 1997**).

Le mode d'action de la cyclosporine sur le système immunitaire a été mis en évidence . La molécule pénètre dans le cytoplasme des lymphocytes T helper et forme un complexe avec une protéine cytosolique : la cyclophiline (**Khalil, 1997 ; Benoit-Biancamano, 2009**). Ce complexe bloque la calcineurine, ce qui entraîne l'inhibition de la phosphorylation et la translocation nucléaire du NFAT (**figure 53**). Il en résulte l'inhibition de les principales cellules impliquées dans le rejet, à savoir le LTh et le LTc (**Ansermot, 2007 ; Benoit-Biancamano, 2009**).



**Figure 52 :** Les différentes voies de signalisations dans le lymphocyte T (Goldsby et al., 2000).

La diminution significative du taux des leucocytes et plus particulièrement les Lymphocytes T dans le lot traité à la cyclosporine A par rapport au lot témoin est dû à l'effet inhibiteur de la prolifération et l'activation des lymphocytes T. En effet, l'examen des frottis périphériques du lot qui a reçu la cyclosporine A (CsA) était très pauvre en leucocytes, notamment les lymphocytes. L'effet inverse a été constaté dans les lots CH et H où on a remarqué une augmentation significative des leucocytes et plus précisément les lymphocytes. Ces résultats suggèrent que homogénat du pied du gastéropode *Helix aspersa* agit sur les cellules T par l'intermédiaire d'une voie CsA-sensible, en activant la production de l'IL-2.



**Figure 53:** Schéma résumant le mécanisme d'action de la cyclosporine A (Fantini *et al.*, 2006)

Nos résultats montrent aussi une diminution significative des granulocytes dans le lot traité par la cyclosporine. Cela pourrait s'expliquer par l'effet de la cyclosporine sur les granulocytes. Les résultats montrent aussi l'absence d'effet de l'homogénat sur cette population.

L'examen des frottis périphériques a montré un changement de la forme des hématies. Ce résultat est expliqué par le fait que la CsA agit également sur ces cellules. Des travaux ont montré la présence de l'immunophiline dans le cytoplasme des hématies, qui peut lier la cyclosporine, ce qui entraîne l'altération des érythrocytes (Foxwell *et al.*, 1988). Dans les deux lots CH et H, les hématies présentent une structure normale, indiquant l'effet protecteur de l'homogénat.

L'analyse des frottis médullaires chez différents groupes traités a montré que la cyclosporine A a un effet sur la moelle osseuse en entraînant une diminution des cellules. Les frottis médullaires des lots CH et H étaient plus riches en précurseurs médullaires. Ce résultat indiquerait un effet stimulateur de l'homogénat sur l'hématopoïèse.

Les résultats de cette étude indiquent l'effet immunostimulant et protecteur de l'homogénat d'*Helix aspersa* sur les différentes populations cellulaires sanguines. La présence de polyphénols, de lectines ou autres biomolécules, pourrait expliquer le potentiel immunostimulant du pied du gastéropode *Helix aspersa* sur les lymphocytes T.

L'utilisation clinique de la cyclosporine est malheureusement accompagnée de plusieurs effets secondaires tels que la néphrotoxicité, la cardiotoxicité, l'hépatotoxicité (**Bianchi et al., 2003 ; Rezzani, 2004**). De plus, les receveurs doivent maintenir la thérapie tout au long de leur vie. Plusieurs mécanismes ont été proposés concernant l'hépatotoxicité induite par la cyclosporine A : la production des espèces réactives d'oxygène (ROS), l'altération du système antioxydant hépatique et l'augmentation de la peroxydation lipidique (**Andrès et al., 2000 ; Durak et al., 2004**). De ce fait, il est important de maintenir un équilibre entre les molécules anti-oxydantes et les radicaux libres chez les patients greffés et traités par la cyclosporine A.

Dans notre étude, le traitement des rats avec la cyclosporine à la dose (20-60 mg/mL) pendant 21 jours n'a entraîné aucun décès chez les animaux. Le médicament induit une augmentation de la quantité des transaminases TGO et TGP chez les rats. Il est bien connu que l'augmentation du taux des transaminases indique une cytolyse hépatique (**Herrera, 1993**), ces enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Ces enzymes sont présentes dans plusieurs tissus et organes (foie, cœur, reins, muscles...). Plusieurs études ont montré que chez le rat, la dose de 20 mg/Kg/j de la cyclosporine A administrée pendant 21 jours, induit une augmentation du taux des transaminases (**Hagar, 2004 ; Kaya et al., 2008 ; Erarslan, et al., 2010**). L'association de la cyclosporine A avec l'homogénat diminue significativement le taux des transaminases.

Par ailleurs, une augmentation de la quantité du MDA a été observée dans le lot traité à la cyclosporine A. Cela suggère une peroxydation lipidique résultant d'une lésion hépatique. Le MDA est l'un des produits terminaux formé lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres. Les taux élevés de MDA suggèrent donc un stress oxydatif. Le traitement par l'homogénat du mollusque *Helix aspersa* a induit une diminution du taux du MDA hépatique.

Il est connu qu'en réponse à l'accumulation des ROS, les hépatocytes activent un mécanisme de défense et de détoxification à travers divers enzymes anti-oxydantes. Les principaux systèmes de détoxification sont la catalase et le GSH. La catalase est une enzyme

antioxydante qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et dihydrogène. Le glutathion réduit participe aussi au cycle d'oxydoréduction pour convertir l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et le peroxyde de lipide en produits non toxiques. (**Gutteridge, 1995**). Des chercheurs ont montré que le taux du GSH hépatique chez les rats traités avec la cyclosporine A diminue, ce qui conduit à la diminution du rapport glutathion réduit/glutathion oxydé dans les hépatocytes de rats en culture (**Hagar, 2004**). Cette diminution du glutathion est expliquée par l'inhibition de la GSH peroxydase et est responsable en partie de l'hépatotoxicité (**Inselmann et al., 1994**).

Le mécanisme anti-oxydant des molécules biologiques testées n'est pas totalement connu. L'inhibition de la peroxydation lipidique est un effet anti-oxydant indirect qui empêche l'augmentation de la perméabilité membranaire résultant de la lésion oxydante du foie (**Fukuzawa et al., 1995**).

Dans notre étude, nous avons montré que la capacité antioxydante a été significativement réduite dans le tissu hépatique des animaux traités par la cyclosporine A. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans plusieurs travaux (**Andrès et al., 2000 ; Durak et al., 2002 ; Hagar, 2004 ; Kaya et al., 2008 ; Erarslan, et al., 2010**). L'effet inverse a été observé avec l'association homogénat-cyclosporine. En effet, nous avons remarqué la restauration de la capacité anti-oxydante comparativement au groupe traité par la cyclosporine A seule et que le traitement de la cyclosporine associée à l'homogénat semble protéger les hépatocytes contre la toxicité induite par la cyclosporine.

Le traitement par l'homogénat semble prévenir la peroxydation lipidique, diminuer l'activité des enzymes ALAT et ASAT induite par la cyclosporine et augmenter l'activité du système anti-oxydant (catalase et glutathion réduit). Ces résultats suggèrent que l'homogénat rétablit l'équilibre entre les oxydants et les antioxydants, perturbé par la cyclosporine dans le tissu hépatique.

Cet effet pourrait être expliqué par la présence d'une part des polyphénols et des lectines, démontrée dans la présente étude et, d'autre part, par la présence des oligoéléments :  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Se}^{2+}$  accumulés dans la chair de cette espèce qui font partie du système antioxydant non enzymatique (**Gomot, 1998 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008 ; Toader, 2009**). La fonction de ces oligoéléments seraient de piéger les radicaux  $\text{l'O}_2^{\cdot}$  et  $\text{l'OH}^{\cdot}$ . La présence de la vitamine C et de la vitamine E qui sont produites par les glandes localisées sur la peau, empêcherait la peroxydation lipidique (**Zaafour, 2014**).

Nous pouvons suggérer, dès lors, que l'administration de l'homogénat de l'escargot *Helix aspersa* aurait un rôle thérapeutique comme agent anti-oxydant dans la prévention de la toxicité induite par la cyclosporine A et pourrait être associé au régime chez les patients greffés.

Dans une deuxième partie, et dans le but d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits aqueux, hydroalcoolique et organique préparés à partir du pied de l'escargot *Helix aspersa*, un modèle animal de l'inflammation pulmonaire a été développé, par instillation intra-trachéale de particules de Séphadex G-200.

C'est un modèle de l'inflammation aiguë des bronches et des alvéoles. Il est connu que la progression de la réaction inflammatoire est caractérisée par l'afflux de cellules inflammatoires circulantes dans le tissu y compris les éosinophiles et les neutrophiles. Ces cellules inflammatoires pourraient endommager le tissu pulmonaire via la production de cytokines pro-inflammatoires, de protéases, de la myéloperoxydase, de lysozymes et des espèces réactives de l'oxygène ce qui aboutit à la formation de l'œdème (**Dallegrì et Ottonello, 1997 ; Mastrangelo et al., 1998**). Il constitue un modèle idéal pour l'évaluation des effets anti-inflammatoires des biomolécules.

Les particules de Séphadex traversent l'épithélium bronchique et induisent le chimiotactisme des éosinophiles. Ces derniers provoquent l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux, la formation de l'œdème, la contraction du muscle lisse et l'hypersécrétion du mucus par les cellules caliciformes. La présence des éosinophiles est le résultat de la production de l'IL-5 par les LTh2. Cette cytokine induit le recrutement des cellules inflammatoires dans le poumon qui pourrait être associé à une augmentation de l'expression de chimiokines, des cytokines, des médiateurs lipidiques (**Namovic et al., 1996 ; Haddad et al., 2002**) et la formation du granulome composé de macrophages, de monocytes, d'éosinophiles et de cellules géantes multinucléées. Le macrophage secrète les protéases, les leucotriènes et des facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles. Une fois dans le tissu pulmonaire, les neutrophiles jouent un rôle très important dans l'inflammation. En effet, ces cellules inflammatoires s'accumulent et commencent à produire dans le parenchyme pulmonaire des granules contenant des enzymes telles que l'élastase et la myéloperoxydase (**Kierszenbaum, 2002**). La présence de protéases au niveau du parenchyme pulmonaire entraîne la dégradation massive des fibres élastiques de la paroi bronchioalvéolaire. Les fibres élastiques sont un

constituant important des bronches et de la paroi alvéolaire ; leur destruction provoquerait la perte de l'élasticité et la formation de l'emphysème (**Kierszenbaum, 2002**).

L'augmentation très significative de leucocytes dans le BALF du lot Sx indique l'inflammation du poumon. L'observation de l'inflammation cellulaire dans le tissu pulmonaire et en concordance avec l'augmentation dans le taux des leucocytes totaux et dans le BALF. Plusieurs études ont montré l'augmentation des cellules inflammatoires chez des rats instillés par le Séphadex en comparaison avec les rats témoins. **Evaldsson et al. (2011)** ont démontré une augmentation du taux des leucocytes principalement des éosinophiles et des neutrophiles.

Le traitement par les trois extraits aqueux, hydroalcoolique et organique a diminué significativement le taux des leucocytes totaux dans le BALF et ont diminué l'inflammation observé dans le lot Sx, ce qui indique un effet modulateur des extraits d'*Helix aspersa* en inhibant le chimiotactisme des cellules inflammatoires.

Par ailleurs, l'examen microscopique des coupes histologiques du poumon, a montré une structure normale de la paroi bronchique avec l'absence du granulome notamment dans le lot traité par les extraits aqueux et hydroalcoolique. En revanche, la co-administration du Séphadex avec l'anti-inflammatoire non stéroïdien (lot Sibü) n'a pas diminué le taux des leucocytes totaux dans le sang. Cependant, elle l'a diminué dans le BALF. Cette diminution pourrait être due à son effet local, au niveau du tissu pulmonaire, en inhibant le chimiotactisme des cellules inflammatoires.

L'administration du Séphadex a provoqué l'augmentation du poids des poumons suite au flux du fluide dans ceux-ci. Ce résultat est similaire à celui obtenu par **Evaldsson et al. (2011)**. Le traitement par l'AINS semble aggraver l'œdème dans les poumons. En revanche, l'œdème a diminué après le traitement par les extraits aqueux et hydroalcoolique où on a enregistré le même poids que chez les rats témoins et aucun changement dans le lot qui a reçu l'extrait organique par rapport aux rats du lot Sx.

L'augmentation de la concentration des protéines dans le BALF du lot Sx pourrait indiquer l'augmentation de la production des cytokines inflammatoires. Des études réalisées auparavant ont montré l'activation de la production du TNF  $\alpha$ , des leucotriènes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E et de la prostaglandine E<sub>2</sub>, suite à l'instillation du Séphadex dans la trachée des rats (**Evaldsson et al., 2011 ; Zhipeng et al., 2012 ; Nagar et al., 2015**).

Le traitement par l'AINS a induit une diminution de la concentration des protéines ce qui confirme leur effet anti-inflammatoire probablement en bloquant la synthèse et la production de quelques médiateurs inflammatoires (médiateurs lipidiques) et en agissant sur la voie COX notamment la COX2. Les AINS sont parmi les médicaments les plus utilisés dans le monde en raison de leur effet anti-inflammatoire et anti-douleur. Leur principal mode d'action est l'inhibition de l'enzyme pro-inflammatoire cyclooxygénase ou COX. Il existe des AINS inhibiteurs non sélectifs de COX qui inhibent à la fois la COX 1 et la COX 2 et des inhibiteurs sélectifs de COX 2 (Helms, 2006 ; Gautam & Jachak, 2009 ; Rang & Dale, 2012).

Afin de valider l'inflammation au niveau du poumon, de vérifier l'implication des neutrophiles, et de comprendre le mécanisme inflammatoire, nous avons dosé l'activité de la myéloperoxydase. La myéloperoxydase est le constituant majeur des granules des neutrophiles. C'est une enzyme hémique avec une activité peroxydase et de chloration. Elle utilise l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour produire l'acide hypochloreux (HOCl), un oxydant fort. Elle possède une activité bactéricide et cytotoxique (Sertejn *et al.*, 2003). Les résultats ont montré une forte activité de cette enzyme dans le BALF du lot qui a reçu le Séphadex par instillation intratrachéale. Le traitement par les extraits aqueux, hydroalcoolique et organique a entraîné une diminution de cette enzyme dans le BALF. L'utilisation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien a également diminué l'activité de la MPO.

L'élévation de l'activité de la MPO indique une importante activation des neutrophiles, la présence du peroxyde d'hydrogène reflète un stress oxydatif au niveau des cellules pulmonaires qui résulte d'une réaction inflammatoire incontrôlée et une dégranulation massive des neutrophiles (Sertejn *et al.*, 2003). Elle peut engendrer une destruction locale du tissu (Sertejn *et al.*, 2003). Dans l'inflammation aiguë, la concentration de la MPO augmente dans les alvéoles en corrélation avec une activité oxydante dans le liquide du lavage alvéolaire, avec le nombre des neutrophiles et avec d'autres produits de leur dégranulation tel que l'élastase (Eiserich *et al.*, 1998 ; Mathy Hartert *et al.*, 2000). De plus, la MPO désactive les anti-protéases, ce qui permet à l'élastase de passer dans le liquide bronchoalvéolaire (Suter *et al.*, 1992). Elle diminue également les défenses antioxydantes (Winter-bourn et Brennan, 1997). L'augmentation de l'activité de la MPO pourrait être également due à la production des ROS par les cellules pulmonaires sous l'effet du Séphadex.

La diminution de l'activité de la MPO dans les lots traités par les trois extraits indique que ces derniers ont rétabli un équilibre entre les oxydants et les antioxydants au niveau du tissu pulmonaire. On pense également que cette diminution est due à la diminution de l'activité des neutrophiles dans le BALF en inhibant la production de l'élastase ou par l'inhibition de leur adhésion à l'endothélium et leur migration trans-endothéliale. L'activité hémagglutinante d'*Helix aspersa* pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'adhésion et du processus de diapédèse par interaction des molécules agglutinantes contenues dans les extraits avec les molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales telle que la sélectine E.

Nos résultats montrent que des extraits d'*Helix aspersa* avaient un effet sur l'inflammation pulmonaire. A notre connaissance, aucune étude préalable n'a encore évalué l'effet anti-inflammatoire sur les poumons des différents extraits de ce gastéropode. Cependant, notre équipe a évalué l'effet protecteur de sa bave contre une colite chimio-induite. Les auteurs ont montré que la bave diminue l'inflammation induite par l'acide acétique au niveau du colon et ont suggéré que les molécules bioactives contenues dans la bave du mollusque ont un effet antioxydant en diminuant la peroxydation lipidique (**Hatuikulipi et al., 2016**).

L'activité antitumorale des extraits aqueux, hydroalcoolique et organique d'*Helix aspersa* a également été évaluée. Dans une première partie nous avons évalué l'effet cytotoxique des extraits aqueux et hydroalcoolique contre deux lignées tumorales du lymphome cutané Hut-78 et SeAx. Dans une deuxième partie, nous avons mesuré l'effet antiprolifératif des extraits hydroalcoolique et organique contre des lignées cellulaires normales (MK2) et tumorales matricielles (A549 et Huh7) et une lignée tumorale liquide (K562). Les trois extraits préparés à partir du gastéropode ont montré une activité cytotoxique contre les lignées tumorales testées. En effet, l'extrait aqueux, utilisé à la dose de 50µg/mL, a induit 44,09% de mortalité dans la lignée tumorale Hut-78 et 31,47% dans la lignée tumorale SeAx. L'extrait hydroalcoolique utilisé à la même concentration (50µg/mL) a induit 29,9 % de mort cellulaire de la lignée Hut-78 et 25,0% pour la lignée SeAx. Nous avons montré que l'extrait aqueux était plus cytotoxique que l'extrait hydroalcoolique envers la lignée tumorale HUT-78. Ce résultat pourrait s'expliquer par la composition chimique de l'extrait aqueux ainsi que par les caractéristiques de la lignée tumorale Hut-78.

Les deux lignées tumorales Hut-78 et SeAx dérivent en effet du sang périphérique de patients atteints du syndrome Sézary âgés respectivement de 50, et 70 ans. La lignée tumorale Hut-78 est résistante à l'apoptose, ce sont des lymphoblastes produisant l'IL-2 et le TNF $\alpha$ . Ils

expriment l'IL-2R et sont CD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Elles présentent des mutations touchant les gènes myc et p53 (Woetmann *et al.*, 2007). Parmi les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles de la lignée tumorale SeAx, on peut citer une activité aberrante de Jak3 (Janus Kinase 3) et de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), une résistance à l'apoptose et à l'inhibition de la croissance par l'IFN, ainsi que la production de IL-5, IL-6, IL-13 et le VEGF. La lignée tumorale SeAx est CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup> et CD<sub>8</sub><sup>-</sup> (Woetmann *et al.*, 2007).

Par la suite, nous avons également analysé la morphologie des noyaux et la condensation de la chromatine de la lignée tumorale Hut-78 incubées avec l'extrait aqueux.

L'utilisation du colorant nucléaire Hoechst nous a montré que les cellules tumorales incubées en présence de l'extrait aqueux apparaissent en apoptose avec des noyaux fragmentés et une chromatine très condensée. Ces résultats doivent être confirmés par une analyse de l'expression des gènes apoptotiques.

Le test MTT a révélé que l'extrait hydroalcoolique a une activité antiproliférative de 15% sur la lignée tumorale hépatocytaire Huh7. En revanche il n'a aucune activité envers la lignée cellulaire normale MK2 ainsi que les deux lignées tumorales A549 et K562. L'extrait organique n'a pas d'effet sur la lignée cellulaire normale MK2, ni vis-à-vis les lignées tumorales K562 et A549. En revanche, il a entraîné 50 % d'inhibition de la lignée tumorale Huh7. Ces résultats montrent un effet sélectif des molécules des extraits organique et hydroalcoolique vis-à-vis des lignées normales et cancéreuses. Nous suggérons que la présence des polyphénols et de lectines serait responsable de l'activité antiproliférative observée.

Peu de travaux ont évalué, jusqu'à présent, l'effet antiprolifératif du mollusque *Helix aspersa*. En 2013, notre équipe a démontré une activité très cytotoxique de l'extrait aqueux vis-à-vis cellules tumorales du cancer du sein. Il a été démontré que l'extrait induit une nécrose dans ces cellules en diminuant le taux de Bcl-2 dans la lignée tumorale Hs578T et a été suggéré que les lectines et les polyphénols en soient responsables (El ouar *et al.*, 2013).

Récemment notre équipe a aussi montré un effet protecteur du même extrait contre l'hépatotoxicité induite par un carcinogène chimique La N-méthyl-N-nitrosourée (ou N-nitroso-N-méthylurée). L'extrait a inhibé le processus de la carcinogénèse dans le foie et a stimulé la différenciation des macrophages en cellules géantes dans la rate (El Ouar *et al.*, 2016). En 2014, Antonova et ses collaborateurs ont démontré un effet antiprolifératif contre

plusieurs lignées tumorales de l'hémocyanine d'*Helix aspersa*; une molécule responsable du transport de gaz chez les mollusques (**Antonova et al., 2014**). Des travaux ont pu mettre en évidence des propriétés immunostimulantes et anti-tumorales de l'hémocyanine (**Burke et al., 1977**). Chez l'homme, la protéine permet de détruire les tumeurs et d'activer le système immunitaire (**Lamm et al., 2000**). D'autres études ont démontré ces mêmes effets sur plusieurs types de cancers, dont le cancer du sein, de la prostate et du pancréas (**Riggs et al., 2002**). Le mécanisme d'action de l'hémocyanine impliquerait un effet immuno-modulateur sur divers types de cellules immunitaires, conduisant à l'apoptose des cellules malignes (**Tzianabos, 2000**).

D'autres travaux ont été menés sur d'autres mollusques. Une équipe de chercheurs a mis en évidence un glycosaminoglycane (acharan sulfate) dans la chair de l'escargot africain : *Achatina fulica* (**Kim et al., 1996**). Cette molécule dont le poids moléculaire est de 114 kDa est sécrétée à la surface suite à une stimulation de l'animal (**Jeong et al., 2001**) et possède plusieurs activités biologiques, notamment l'inhibition de la croissance de la tumeur chez des souris greffées par des cellules de sarcome. Cette activité anti-tumorale serait due à son action inhibitrice de l'angiogénèse par la diminution de l'expression de FGF ainsi que la formation des tubes *in vivo* induite par le VEGF (**Ghosh et al., 2002 ; Lee et al., 2003**). L'acharan sulfate peut aussi augmenter la production des cytokines (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ), l'expression *in vitro* des molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2, le CD40 ainsi que les molécules de présentation de l'antigène CMH II par des cellules dendritiques immature (**Kim et al., 2007**).

D'autres chercheurs se sont intéressés à l'étude de peptides isolés à partir de plusieurs éponges marines dont la majorité sont des peptides cycliques. Ces cyclopeptides sont des métabolites secondaires qui possèdent de nombreuses activités biologiques notamment l'activité anticancéreuse (**Malaker & Shah, 2013**). Un de ces peptides a été testé sur des lignées tumorales. Il a été montré qu'il induit l'apoptose dans ces lignées tumorales en activant la caspase-3 et en diminuant l'expression de la bcl-2 (**Odaka et al., 2000 ; Cioca et al., 2002**). Ce même peptide a un effet antimittotique suite à sa capacité de liaison à la tubuline (protéine des microtubules, constituant majeur du cytosquelette) (**Gamble et al., 1999 ; Loganzo et al., 2003**).

D'autres peptides ont été isolés à partir de plusieurs mollusques, dont on peut citer : la contoxine. Comme son nom l'indique, ce peptide a été isolé à partir d'un escargot marin appartenant au genre *Conus* (**Malaker & Shah, 2013**). Ces peptides ont plusieurs effets:

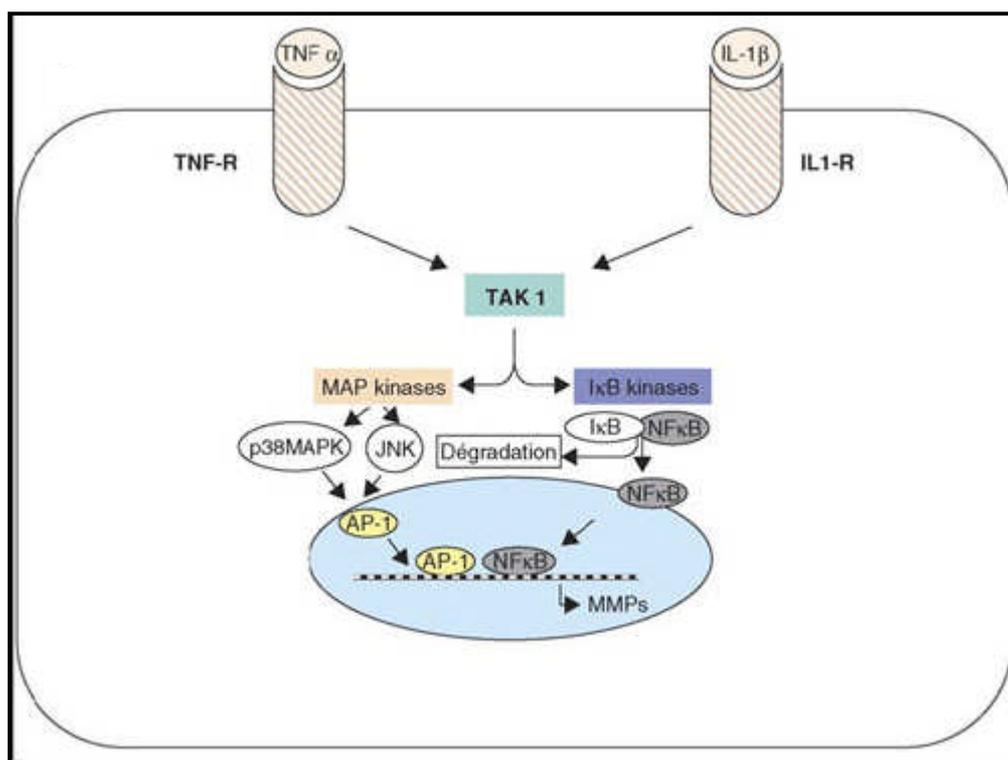
- Un effet antimitotique en inhibant l'assemblage des microtubules et leur polymérisation ; bloquant ainsi les cellules cancéreuses en métaphase (**Poncet *et al.*, 1999**).
- Un effet antitumoral en induisant un désordre dans la fonction lysosomiale, ce qui entraîne la mort cellulaire (**Garcia-Rocha *et al.*, 1996**).
- Un effet bloquant de l'expression de quelques gènes codant pour des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN et la prolifération cellulaire induisant ainsi l'inhibition de la croissance et de l'invasion tumorale (**Martin-Algarra *et al.*, 2009**).

Afin d'examiner l'activité antiproliférative des extraits aqueux et organique sur les lignées tumorales HUT-78 et SeAx, nous avons évalué la production de l'une protéase impliquée dans l'angiogénèse et l'invasion tumorale. La cellule tumorale a la capacité de subir des métastases et d'envahir les tissus sains, grâce à la présence d'une famille de protéases appelées métalloprotéinases (MMPs). Ces enzymes dégradent les composantes de la matrice extracellulaire et permettent aux facteurs pro-angiogéniques séquestrés dans la MEC de se libérer.

La MMP-9 est une protéase de 92 kDa, produite par plusieurs types cellulaires notamment les cellules inflammatoires telles que les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (**Coussens *et al.*, 2000 ; Pollard, 2012**). Elles ont été largement impliquées dans l'invasion tumorale et les métastases (**Antonicelli *et al.*, 2012**). En effet, plusieurs études ont montré un lien entre la surexpression de la MMP-9 et le développement tumoral (**Hanahan & Weiberg, 2000 ; Egeblad & Werb, 2002 ; Overall & Kleifield, 2006**).

La synthèse de la MMP-9 est régulée par plusieurs facteurs de transcription : le NFkB, AP-1, AP-2 et SP-1 (**St-Pierre *et al.*, 2004**). Ces facteurs peuvent activer plusieurs cascades de transduction notamment la voie activant la protéine kinase C (PKC) et la voie des MAPKinases. (**Roy, 2007**). Son inhibition est assurée par quelques cytokines via la cascade de transduction de JAK/STAT, (**figure 54**) (**Ramana *et al.*, 2000**).

En comparant nos résultats avec les témoins positifs et négatifs, nous avons constaté que la stimulation des deux lignées tumorales de lymphome cutanés Hut-78 et SeAx par les deux extraits aqueux et hydroalcoolique avec des concentrations de 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL et 50µg/mL, n'a pas entraîné une modification dans l'expression de la MMP-9.



**Figure 54** : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression des MMPs (**Rannou et al., 2005**).

L'absence d'effet des extraits indique que les différentes molécules contenues dans les deux extraits aqueux et hydroalcoolique n'a induit aucune modification au niveau moléculaire dans la cascades de transduction qui peuvent activer l'expression de la MMP-9 dans la lignée SeAx ou inhiber la production de cette protéase dans la lignée tumorale HUT-78.

L'analyse des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* a montré que les trois extraits aqueux, hydroalcoolique et organique préparés à partir du pied du gastéropode *Helix aspersa* présentent plusieurs activités biologiques. Nous avons essayé de fractionner les protéines solubles à partir de la chair d'*Helix aspersa* en réalisant une précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. Après précipitation de l'extrait brut d'*Helix aspersa*, deux fractions ont été obtenues par centrifugation et dialysées contre de l'eau. La lecture de l'absorption ultraviolet ainsi que l'électrophorèse SDS-PAGE, indiquent que seulement l'extrait C contient des protéines. Une activité enzymatique dans la fraction C a été détectée en utilisant trois substrats fluorophores synthétiques (Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC). Cette activité a augmenté après le fractionnement par chromatographie sur Q-Sepharose. En effet, nous avons enregistré une activité protéolytique dans la fraction P1 envers le substrat Z-Arg-Arg-AMC et

une forte activité enzymatique dans la fraction P2 envers le même. Cependant, nous n'avons détectée aucune activité enzymatique dans la fraction P3, ce qui indique l'absence de protéases susceptibles de cliver les substrats utilisés. Par ailleurs, une forte diminution de l'activité protéolytique a été enregistrée dans la fraction P2 après l'utilisation de l'inhibiteur de protéase à sérine (pefabloc) ce qui suggère la présence de cette classe de protéases. Après l'utilisation de l'iodocétamite, un inhibiteur de protéase à cystéine, nous avons constaté une très faible diminution de l'activité protéolytique dans la fraction C et dans P2 ce qui montre que l'activité protéolytique est principalement due à des protéases à sérine ou éventuellement à d'autres classes de protéases non investiguées dans cette étude. Par ailleurs, on peut exclure la présence de protéases à cystéine dans P1 puisqu'aucune diminution de l'activité enzymatique n'a été notée en présence de l'iodoacétamide.

L'activité antiproliférative en utilisant le test MTT des extraits C et F ainsi que les fractions obtenues par chromatographie échangeuse d'anions a été évaluée contre plusieurs lignées cellulaires normale (MK2) et tumorales (A549, Huh7 et K562).

La fraction C qui représente l'extrait protéique total présente une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire normale MK2 et un très faible effet antiprolifératif contre la lignée tumorale Huh 7. Cependant, elle n'a montré aucune activité sur les lignées tumorales A549 et K562.

Les fractions P1, P2 et P3 obtenues après la chromatographie échangeuse d'anions de l'extrait C ont des effets variables vis-à-vis des lignées testées. La fraction non retenue de la chromatographie échangeuse d'anions (P1) était très riche en protéine de différents poids moléculaire. L'analyse SDS-PAGE a révélé la présence de plusieurs bandes protéiques difficiles à identifier à l'exception de deux populations protéiques dont le poids moléculaire varie respectivement entre 14,4 et 21,5 kDa et 7 kDa. De plus, P1 n'était pas toxique contre les lignées utilisée y compris la lignée cellulaire normale. Il faut rappeler que le test de l'activité enzymatique ainsi que l'utilisation des inhibiteurs a révélé la présence d'une protéase de type protéase à sérine. Vu la faible activité on suppose que l'enzyme était en faible concentration.

Quant à la fraction P2 qui représente la première fraction retenue sur la chromatographie échangeuse d'anions, nous avons noté qu'elle est aussi riche en protéines que P1. L'analyse SDS-PAGE a révélé la présence de deux bandes protéiques majoritaires dont le poids moléculaire est supérieur à 66,5 kDa, une bande avec un poids moléculaire apparent de 26

kDa environ, une autre avec un PM inférieur à 14,4 kDa et une bande avec un PM inférieur à 14 kDa. L'étude de l'effet anti-prolifératif a montré une très forte activité contre la lignée tumorale liquide lymphoblastique K562 avec une inhibition de 38%. Cet effet pourrait être dû à la présence de la/des protéase/s à sérine mais des études complémentaires doivent être réalisées pour confirmer cette hypothèse, notamment par l'utilisation d'échantillons actifs et bloqués.

**Matsuura et al. (2016)**, ont pu isoler une protéase à sérine homologue au granzyme A chez les mammifères, à partir d'un poisson et ont pu mettre en évidence son activité cytotoxique. Le granzyme est une enzyme clé dans l'immunité cellulaire. Elle joue un rôle crucial dans la réponse anti-tumorale. Les cellules tumorales peuvent être détruites par une activité des effecteurs cytotoxiques spécifiques (LTC) et non spécifiques (NK). Le mécanisme de cytotoxicité cellulaire induite par ces cellules cytotoxiques a été bien caractérisé ; les granules cytotoxiques contenant la perforine et le granzyme sont produits à l'extérieur de la cellule (**Peters et al., 1991**). La perforine perturbe la membrane plasmique de la cellule cible et les granzymes pénètrent dans le cytoplasme (**Trapanie et Smyth, 2000**). Une fois dans le cytoplasme les granzymes hydrolysent des molécules apoptotiques et activent des signaux apoptotiques.

Ces granzymes sont des protéases à sérine d'un poids moléculaire de 26 kDa (**Matsuura et al., 2014 ; Matsuura et al., 2016**). Quatre activités enzymatiques différentes ont été reportées : tryptase (clive après les résidus Arg ou Lys), asp-ase (clive après Asp), chymase (clive après Trp, Phe ou Tyr) et met-ase (clive après Met) (**Kam et al., 2000 ; Matsuura et al., 2016**). Dans la cellule cible, le granzyme A possède plusieurs substrats cellulaires et peut activer l'apoptose par deux voies : une apoptose caspase-dépendante (**Andrade et al., 1998**) après l'hydrolyse de la caspase 3 et une voie indépendante des caspases (**Chowdhury et al., 2006**) (**figure 55**).

La fraction P3 n'a révélé aucune activité enzymatique. L'analyse par SDS-PAGE a révélé la présence de 3 bandes protéiques majeures : une bande d'environ 80 kDa, une autre de 31 kDa et des bandes de PM situés entre 16 et 16 kDa. Cette fraction n'a pas montré d'effet anti-prolifératif contre la lignée cellulaire normale MK2 et la lignée tumorale K562. Cependant, elle s'est montrée toxique contre les lignées tumorales matricielles A549 et Huh7. Ces résultats suggèrent la présence d'un mécanisme de cytotoxicité exercé par les différentes molécules de cette fraction et qui est différent du précédent (de la fraction P2). Des études

plus approfondie seront nécessaires afin de pouvoir mettre en évidence le mécanisme impliqué dans cette toxicité vis-à-vis de ces deux lignées tumorales matricielles.

L'analyse du filtrat n'a montré aucune activité enzymatique. Le profil électrophorétique a révélé l'absence de bandes protéiques. L'extrait F, représentant le surnageant obtenu après la précipitation des protéines, pourrait contenir autres molécules de nature non protéique telles que les polyphénols, les sucres ... etc. Le test MTT a montré une toxicité de cet extrait contre les lignées adhérentes normales et tumorales (MK2, HUH7, A549) et une très faible activité cytotoxique sur la lignée tumorale liquide (K562). Ce dernier résultat pourrait nous renseigner indirectement sur l'origine de la toxicité de l'extrait aqueux contre la lignée liquide de lymphome cutané HUT-78 et SeAx qui pourrait s'expliquer par la présence de protéases à sérine

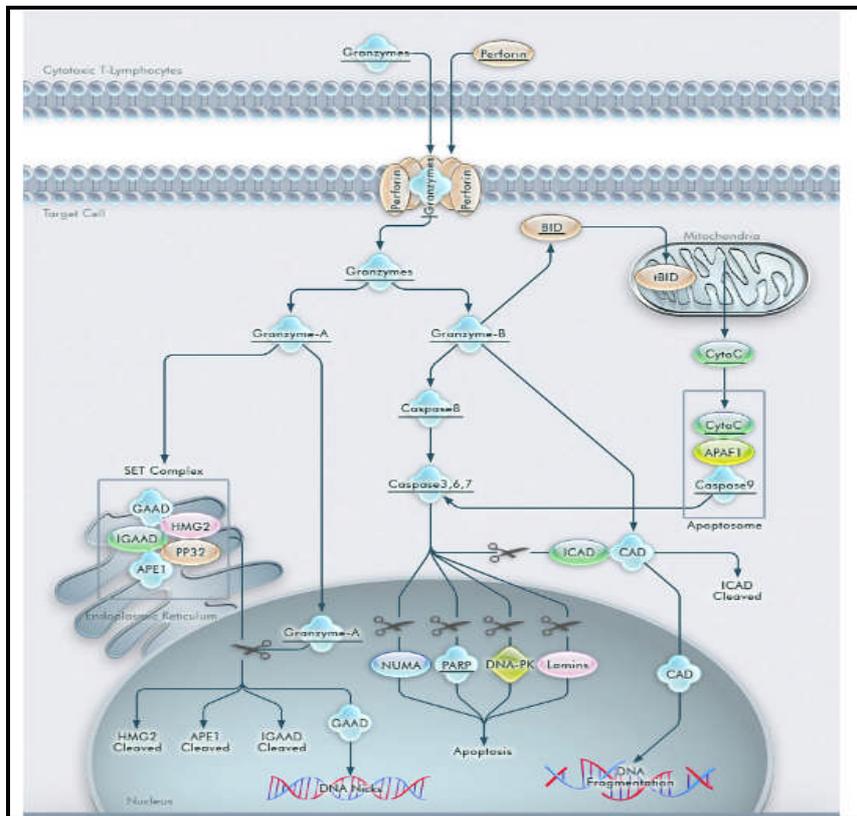


Figure 55: Voies de granzymes dans l'induction de la mort cellulaire dans la cellule cible (3).

**V- Conclusion**  
**et**  
**Perspectives**

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué les effets biologiques de plusieurs extraits issus du gastéropode terrestre *Helix aspersa* : effet anti-inflammatoire, effet anti-angiogénique et effet antitumoral. De multiples effets ont été observés :

- ❖ L'évaluation de l'effet protecteur *in vivo* de l'homogénat chez les rats traités avec un médicament immunosuppresseur (cyclosporine A) a révélé un effet bénéfique contre l'hépatotoxicité induite par l'immunosuppresseur. En effet, l'homogénat aurait un effet anti-oxydant en inhibant la peroxydation lipidique et en activant la production de la catalase et le glutathion réduit. Chez les mêmes animaux, l'homogénat a stimulé la prolifération des leucocytes en particulier les lymphocytes.
  
- ❖ L'administration des extraits aqueux, hydroalcoolique et organique à la concentration de 1 mg/mL, chez les rats présentant une inflammation pulmonaire a montré une activité anti-inflammatoire due probablement à une diminution du taux des leucocytes totaux dans le sang et dans le liquide broncho-alvéolaire. Les extraits ont réduit la taille du granulome provoqué par le Séphadex. Les deux extraits aqueux et hydroalcoolique ont diminué l'œdème. Les trois extraits présentent un effet anti-oxydant au niveau du poumon en diminuant l'activité des neutrophiles qui résulterait de l'inhibition de l'activité de la myéloperoxydase. Ces extraits ont aussi induit une diminution du taux des molécules inflammatoires dans le liquide broncho-alvéolaire. Au niveau tissulaire, nous avons montré que les trois extraits ont diminué l'infiltration des cellules inflammatoires dans les alvéoles pulmonaires, causées par les particules du Séphadex, et ont inhibé la dégradation tissulaire en modulant l'activité des neutrophiles.
  
- ❖ Les deux extraits hydroalcoolique et organique ne se sont pas avérés toxiques sur la lignée normale MK2. En revanche, ils ont montré un effet anti-prolifératif sur la lignée tumorale hépatocytaire Huh7. Les deux extraits EA et EH ont induit une cytotoxicité envers les deux lignées de lymphomes cutanés Hut-78 et SeAx. En effet, l'EA a induit une condensation de la chromatine et une fragmentation nucléaire, alors que EA est supposé induire l'apoptose des cellules T du lymphome cutané.

- ❖ Par ailleurs, les deux extraits EA, et EH n'ont montré aucun effet sur l'expression de la MMP-9.
  
- ❖ L'extraction des protéines solubles par précipitation au sulfate d'ammonium nous a permis d'obtenir deux types d'extraits: un extrait protéique appelé C, et un extrait non protéique F. L'extrait protéique C a révélé la présence de bandes protéiques de différents poids moléculaires. De plus, les tests d'inhibition en utilisant des inhibiteurs spécifiques ont montré l'existence dans cet extrait d'au moins deux familles de protéases, des protéases à sérine et à cystéine. Malheureusement, cet extrait a révélé une activité toxique contre la lignée normale MK2, excluant sa possible valorisation en tant que produit cytotoxique. Le fractionnement de cet extrait sur une colonne Q-Sépharose a donné 3 fractions. Une fraction non retenue (P1) se caractérisant par une faible activité de type protéase à sérine et ne présentant aucune activité cytotoxique. Une fraction retenue (P2) caractérisée par la présence d'une activité à la fois de type protéase à sérine et à cystéine.
  
- ❖ Le test MTT a révélé une activité antiproliférative de cette fraction. En effet, elle a montré une forte activité toxique sur la lignée K562, une faible activité antiproliférative contre la lignée matricielle Huh7 et aucun effet sur les cellules normales MK2. Cet effet cytotoxique est probablement associé à l'activité de type protéase à sérine détectée dans cet extrait. Concernant la troisième fraction protéique (P3), nous avons pu montrer qu'elle ne contient pas d'activité de type protéases à sérine et/ou à cystéine mais présente un effet antiprolifératif contre les deux lignées matricielles A549 et Huh7.
  
- ❖ Finalement, l'extrait non protéique (F) n'est doté d'aucune activité protéolytique mais a montré un effet cytotoxique envers toutes les lignées testées, y compris la lignée non cancéreuse.

En conclusion, *Helix aspersa* collecté à partir de différentes régions de l'Est algérien contient des molécules bioactives qui présentent un effet stimulateur sur les cellules immunitaires et modulateur sur l'inflammation, un effet anti-tumoral en induisant l'apoptose dans les cellules tumorales et pas d'effet anti-angiogénique (pas d'inhibition de la production de la MMP-9).

Au terme de cette étude, certains aspects s'avèrent très intéressants à poursuivre. Il s'agit notamment:

- d'isoler, purifier les polyphénols et les flavonoïdes présents dans les extraits d'*Helix aspersa*, en utilisant différentes techniques chromatographiques, les identifier. On pourrait également valoriser leurs effets anti-oxydants, anti-inflammatoires, et anti-tumoraux *in vitro*.
- de tester les effets anti-inflammatoires des divers extraits sur un modèle animal de l'inflammation chronique.
- d'évaluer l'effet de ces extraits sur la production de molécules inflammatoires *in vitro* et *in vivo*.
- de tenter de purifier et de caractériser la/les lectine/s d'*Helix aspersa* et d'évaluer son effet sur des lignées tumorales.
- d'analyser l'expression des gènes apoptotiques et anti-apoptotiques ainsi que les molécules impliquées dans les différentes voies de signalisation de l'apoptose.
- de tenter de purifier et de caractériser les protéases à sérine et à cystéine détectées dans les divers extraits et de tenter d'établir une relation directe entre l'effet cytotoxique observé dans cette étude et l'activité protéolytique. Pour ce faire, on pourrait utiliser ces protéases purifiées sous leurs formes catalytiquement actives et celles bloquées de manière spécifique et irréversible. Ces études peuvent être réalisées à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* en utilisant des modèles animaux de l'inflammation et du cancer.

# VI- Annexes

**ANNEXE 1**

**Préparation des colorants**

**1. Préparation du May –Grunwald -Giemsa**

**a) Préparation du May-Grunwald (solution mère)**

- Dans un bécher, écraser 0,6g de May-Grunwald en poudre dans un mortier.
- Faire dissoudre la poudre dans 200ml d'éthanol.
- Mettre le bécher dans l'étuve à 50° pendant 15min.
- Agiter à l'aide de l'agitateur magnétique pendant 1heure puis laisser décanter 48h
- Filtrer en utilisant le papier wattman.
- Stocker à l'abri de la lumière.

**b) Préparation du Giemsa (solution mère)**

- Dissoudre 0,75 g de Giemsa en poudre dans 65 ml de méthanol
- Laisser décanter au fond du bécher.
- Agiter d'une façon circulaire pendant 3min.
- Ajouter 65ml de Glycérol.
- Remuer d'une façon circulatoire dans le même sens 3 fois par jours et pendant 4 jours puis filtrer avec du papier wattman.
- Stocker à l'abri de la lumière.

**Dilutions des colorants**

-Le fixateur: May-Grunwald doit être utilisé sans dilution.

-Le Giemsa est dilué à 1/10<sup>ème</sup> :

- ✓ 10ml de Giemsa
- ✓ 10ml de méthanol
- ✓ 80ml d'eau distillée

**2. Préparation du réactif Bradford :**

- Dissoudre 100 mg Bleu de Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol 95 %.
- Rajouter à cette solution 100 ml d'acide phosphorique 85 % (w/v).
- QSP 1L d'eau distillée.

**ANNEXE 2**

**Préparation des solutions utilisées dans la technique de zymographie**

**Préparation du gel de compression**

250µl d'acrylamide 30%

1,337ml d'eau distillée

475µl de Tris 0.5M, pH 6.8

18.75µl de SDS 10%

1.9µl TEMED

18.75µl d'APS

**Préparation du gel de séparation**

1.5ml d'acrylamide à 30%

1.25ml de TRIS 1.5M, pH 8.8,

50µl de SDS à 10%

2.5µl de TEMED (Tétra-Méthyl-éthylèneDiamine)

50µl d'APS (persulfate d'ammonium)

1.65ml d'eau distillée

0.5ml de gélatine (1%)

**Tampons :**

**Tampon de migration (5x)**

10g de SDS ou 100ml de SDS 10%

30g de Tris

144g de glycine

Qsp 2000ml d'eau distillée

**Tampon d'incubation (pH 7.6)**

121.2g de Tris-HCl (50 mM)

15.1g de CaCl<sub>2</sub> (5 mM)

237.8g de NaCl (200mM)

Qsp 2000ml d'eau distillée

**Solution de coloration des gels :**

0.5g de bleu de Coomassie G-250

50ml d'acide acétique glacial

200ml de méthanol

QSP 500ml d'H<sub>2</sub>O

**Solution de décoloration :**

Acide acétique à 10 % (v/v)

Méthanol à 20 % (v/v)

## ANNEXE 3

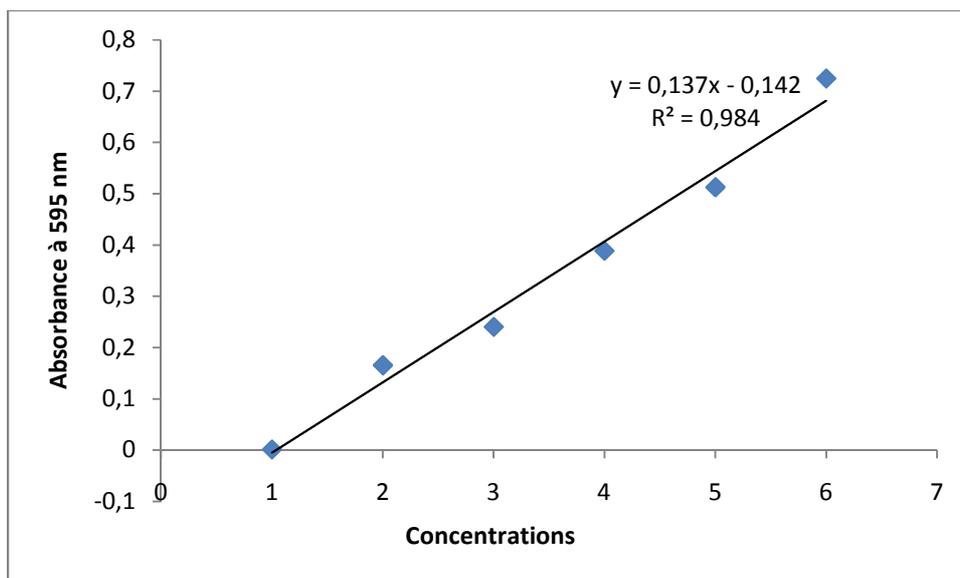


Figure 56: Gamme d'étalonnage réalisée avec la BSA.

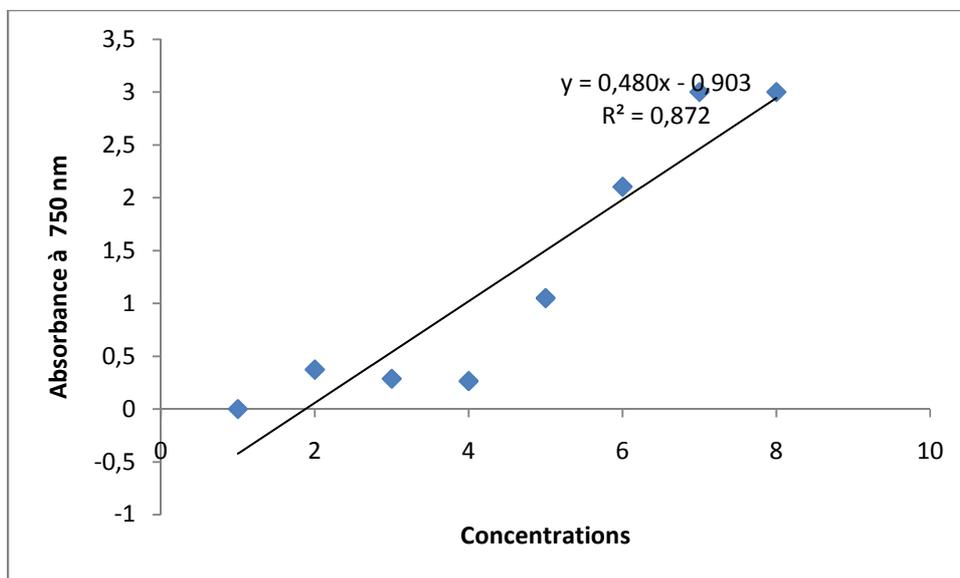
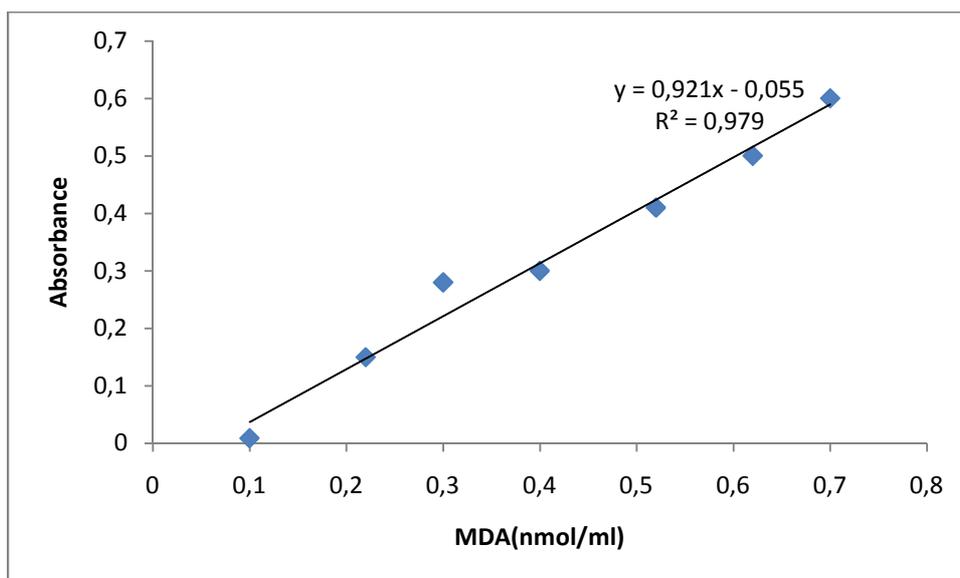
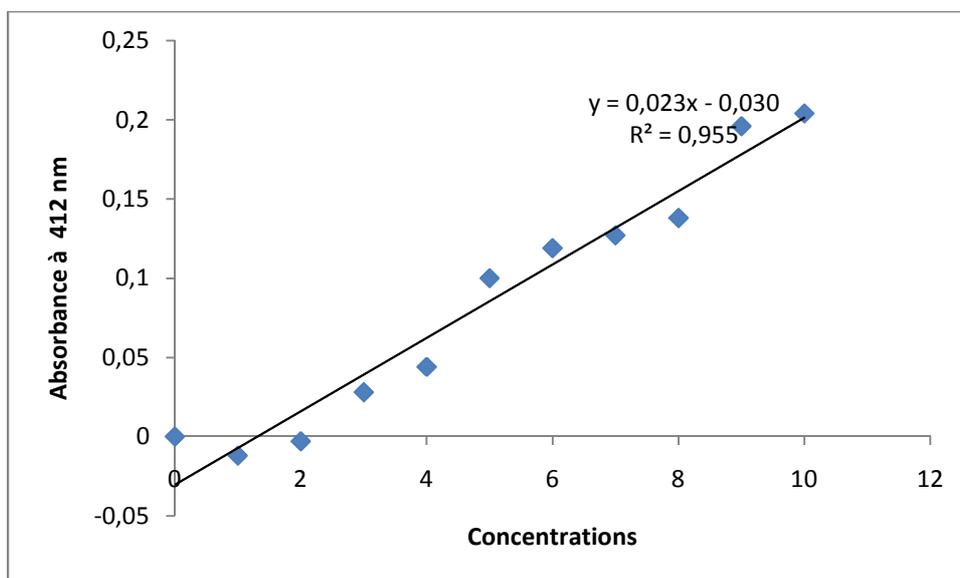


Figure 57 : Gamme d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique.



**Figure 58 :** Gamme d'étalonnage du MDA.



**Figure 59 :** Gamme d'étalonnage réalisée avec le Glutathion réduit.

ANNEXE 4

Tableau de précipitation au sulfate d'ammonium

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C

20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

# **VII- Références bibliographiques**

**Adamowicz, A., Bolaczek, M. (2003).** Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae). Zoological poloniae 48, 93-101.

**Agresti, A., and Bianchi, M. E. (2003).** HMGB proteins and gene expression. Curr Opin Genet Dev 13, 170-178.

**Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A., Casciola-Rosen, L. (1998).** Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. Immunity 8, 451–460.

**Andrés, D., Díez-Fernández, C., Zaragoza, A., Alvarez, A., Cascales, M. (2000).** Changes in antioxidant defense systems induced by cyclosporine A in cultures of hepatocytes from 2- and 12-month-old rats. Biochem Pharmacol 59, 1091–1100.

**Ansermot, N. (2007).** Suivi thérapeutique de la ciclosporine : approche analytique et pharmacogénétique. Thèse de doctorat en Sciences pharmaceutiques. Université de Genève, 215p.

**Antonicelli, F., Vallerand, D., Trussardi-Regnier, A., Grange, F., Hornebeck, W., Bernard, P. (2012).** Regulation of MMPs during melanoma progression. from genetic to epigenetic. Anticancer Agents Med Chem 7, 773-782.

**Antonova, O., Dolashka, P., Toncheva, D., Rammensee, H.G., Floetenmeyer, M., Stevanovic, S. (2014).** *In vitro* antiproliferative effect of *Helix aspersa* hemocyanin on multiple malignant cell lines. Z Naturforsch C 69(7-8),325-334.

**Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007).** Flavonoids as potential therapeutic agents for type 1 diabetes. Medical hypotheses 69(4), 955.

**Bachelet, B. (2003).** Impact de la phytothérapie sur le système immunitaire. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, École Nationale Vétérinaire D'alfort. 139p.

**Baeuerle, P.A. (1998).** IKB-NFκB structures: at the interface of inflammation control. Cell 95, 729-731.

**Baron, J. A. and Sandler, R. S. (2000).** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. Annu Rev Med 51, 511-523.

**Barton, G. M. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* 118, 413-420.

**Benoit-Biancamano, M.O. (2009).** Étude de la pharmacocinétique et de la pharmacogénétique d'un immunosuppresseur. Thèse en Pharmacie. Université de Québec, Laval, 310p.

**Benslimane-Ahmim, Z. (2013).** L'ostéoprotégérine, nouvel acteur dans l'angiogenèse : Rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux et mécanisme d'action. Université Paris Descartes (Paris V). 115p.

**Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. (1963).** Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61, 882-888.

**Bianchi, M. E. (2007).** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5.

**Bianchi, R., Rodella, L., Rezzani, R. (2003).** Cyclosporine A upregulates expression of matrix metalloproteinase 2 and vascular endothelial growth factor in rat heart. *Int Immunopharmacol* 3, 427-433.

**Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A. (1993).** Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4,197-250.

**Bizot, M. (1971).** Activité hémagglutinante des extraits de glande d'albumine de *Helix (Cryptomphalus) Aspersa* et de *Helix (Helix) Pomatia*. *Revue Française de Transfusion*. T. XIV, 4. 445-453.

**Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W. P., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2009).** Marine natural products. *Nat Prod Rep* 26, 170-244.

**Bonizzi, G., Piette, J., Merville, M.P., Bours, V. (2000).** Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappa B activation by interleukin-1. *Biochem Pharmacol* 59, 7-11.

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

**Bonneman, 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* 338, 211-218.

**Bonnet, J.C., Aupinel, P., Vrillon, J.L. (1990).** L'escargot *Helix aspersa*, biologie, élevage. Du labo au terrain. INRA. ISBN: 978-2-7380-0247-1. 124p.

**Borel, JF, Baumann, G., Chapman, I., Donatsch, P., Fahr, A., Muller, E.A., Vigouret, J.M. (1996).** *In vivo* pharmacological effects of cyclosporine and some analogues. *Adv Pharmacol* 35, 115–246.

**Bouquet, A. (1972).** Plantes médicinales de Congo Brazzaville, UVARIOPSIS, PAURIDIANTHA, DIOSPYROS Travaux et document O.R.S.T.O.M. Paris. p9.

**Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

**Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. (1982).** Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78, 206–209

**Braekman, J.C., Dalozé, D., Moussiaux, B., Riccio, R. (1987).** Jaspamide from the marine sponge *Jaspis johnstoni*. *J Nat Prod* 50, 994-995.

**Bray, F., Ren, J.S, Masuyer, E., Ferlay, J. (2013).** Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population. *Int J Cancer* 132(5),1133–1145.

**Bruin, E.C. and Medema, J.P. (2008).** Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews* 34(8), 737-749.

**Burke, G.P., Smith, K.A., Stocking, R.I.G., Ferm, M., McIntyre, R.O. (1977).** Anti-Keyhole limpet hemocyanin antibody in normal unsensitized individuals. *J Allergy Clin. Immunol* 59, 309-313.

**Campion, M. (1960).** The Structure and Function of the Cutaneous Glands in *Helix aspersa*. *Journal of Microscopical Science* 102(2), 195-216.

**Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000).** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

**Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. (1996).** Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

**Carmeliet, P., Ng, Y.S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, J. C., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D'Amore, P. A., Shima, D. T. (1999).** Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature Med* 5, 495-502.

**Chase, R. (1986).** Lessons from Snail Tentacles, *Chemical Senses* 11(4), 411-426.

**Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, B.H., and Kinghorn A.D. (2006).** Drug discovery from natural sources. *AAPS J* 8(2), 239-253.

**Chowdhury, D., Beresford, P.J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J.S., Demple, B., Perrino, F.W., Lieberman, J. (2006).** The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 23, 133-142.

**Cioca, D.P., Kitano, K. (2002).** Induction of apoptosis and CD10/neutral endopeptidase expression by jaspamide in HL-60 line cells. *Cell Mol Life Sci* 59, 1377-1387.

**Citak, E.C., Oguz, A., Karadeniz, C., Akyurek, N. (2008).** Role of gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), and microvessel density on the clinicopathological behavior of childhood non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol* 25, 55-66.

**Claiborne, A. (1985).** Catalase activity. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greenwald RA (ed), CRC Press, Boca Raton, FL, 283-284.

**Corvol, P. (2008).** VEGF, anti-VEGF et pathologies. *Bull Acad Nat Med* 192, 289-302.

**Couffinhal, T., Silver, M., Kearney, M., Sullivan, A., Witzenbichler, B., Magner, M., et al. (1999).** Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of Vascular Endothelial Growth Factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation* 99, 3188-3198.

**Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., Werb, Z. (2000).** MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103, 481-90.

**D'Orazio, N., Gammone, M.A., Gemello, E., De Girolamo, M., Cusenza, S., Riccioni, G. (2012).** Marine Bioactives: Pharmacological Properties and Potential Applications against Inflammatory Diseases. *Marine Drugs* 10(4), 812-833.

**Dallegrì, F., Ottonello, L. (1997).** Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 46(10), 382-391.

**D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P., and Sinigaglia, F. (2003).** Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J Immunol Methods* 273, 3-13.

**Deby-Dupont, G., Deby, C., Lamy, M. (1995).** Espèces oxygénées actives et radicaux libres, In états infectieux graves: perspectives thérapeutiques, ED J carlet, Cl martin, G offenstadt. MAasson 41, 130-144.

**Deligne, C., Teillaud, J.L. (2013).** Le double visage des anticorps monoclonaux en oncologie Immunité passive et vaccination. *médecine/sciences* 29, 57-63.

**Deryugina, E.I., Quigley, J.P. (2006).** Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25, 9-34.

**Desreumaux, P. (2002).** Cytokines, anti-cytokines et nouveaux immunomodulateurs dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *La lettre de l'hépatogastroentérologue* 3, 309-314.

**Dinarello, C.A. (2000).** Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-508.

**Douafer, L. (2010).** Evaluation de la pollution des sols de quelques biotopes de l'Est algérien par l'utilisation d'un bioindicateur, *Helix aspersa* (Mollusca, Gasteropoda): inventaire, activité enzymatique et composition physico-chimique du sol. Mémoire de Magister en Biologie Physiologie Animale. Université d'Annaba. p35.

**Durak, I., Kaçmaz, M., Cimen, M. Y., Büyükköçak, S., Elgün, S., Oztürk, H. S. (2002).** The effect of cyclosporine on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in rabbit hepatic tissues. *Transpl Immunol* 10, 255–258.

**Durak, I., Ozbek, H., Elgun, S. (2004).** Cyclosporine reduces hepatic antioxidant capacity: protective roles of antioxidants. *Int Immunopharmacol* 4, 469–473.

**Egeblad, M., Werb, Z. (2002).** New functions of metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-74.

**Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B., Van Der Vliet, A. (1998).** Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391, 393-397.

**El Ouar, I., Atoui, H., Draa, I., Aggoune C., Naimi D. (2015).** Protective Effect of *Helix aspersa* Extract against Spleen and Liver Injuries Induced by N-Nitroso Methyl Urea in Mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5 (11), 113-116.

**El Ouar, I., Braicu, C., Naimi, D., Irimie, A., Berindan-Neagoe, I. (2013).** Anti tumour effect of aqueous extract from *Helix aspersa*. *Int J Pharm Biol Sci* 4,1325-1332.

**El-Wahidi, M., El-Amraoui, B., Biard, J.F., Uriz, M.J., Fassouane, A., Bamhaoud, T. (2011).** Variation saisonnière et géographique de l'activité antifongique des extraits de deux éponges marines récoltées sur le littoral atlantique d'El Jadida, Maroc. *J Med Mycol* 21, 28-32.

**Erarslan, E., Ekiz, F., Uz, B., Koca, C., Turkcu, U. O., Bayrak, R. Delibasi, T. (2010).** Effects of erdosteine on cyclosporine-A–induced hepatotoxicity in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(1), 32–37.

**Evaldsson, C., Rydén I and Uppugunduri S. (2011).** Isomaltitol exacerbates neutrophilia but reduces eosinophilia: New insights into the Sephadex model of lung inflammation. *International Archives of Allergy and Immunology* 154, 286-294.

**Fajardo, L. F., Kwan, H. H., Kowalski, J., Prionas, S. D. and Allison, A. C. (1992).**

Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *American Journal of Pathology* 140, 539-44.

**Fantini, M.C., Becker, C., Kiesslich, R., and Neurath M. F. (2006).** Drug Insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression. *Gastroenterology and Hepatology* 3, 633-644.

**Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2013).** Globocan 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase 11.

**Ferrara, N. (1999).** Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56, 794-814.

**Folkman, J. (1995).** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.

**Folmer, F., Jaspars, M., Schumacher, M., Dicato, M., Diederich, M. (2010).** Marine natural products targeting phospholipases A2. *Biochem Pharmacol* 80(12), 1793-1800.

**Fong, G. H., Zhang, L. Y., Bryce, D. M., and Peng, J. (1999).** Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126(13), 3015-3025.

**Foxwell, B.M., Frazer, G., Winters, M., Hiestand, P., Wenger, R., Ryffel, B. (1988).** Identification of cyclophilin as the erythrocyte ciclosporin-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 3: 938(3), 447-455.

**Frankowski, H., Gu Y., Hoe Heo J., Milner R., and Zoppo G. J. del. (2012).** Use of Gel Zymography to Examine Matrix Metalloproteinase (Gelatinase) Expression in Brain Tissue or in Primary Glial Cultures. *Methods Mol Biol* 814, 221–233.

**Friesel, R., Maciag, T., 1995.** Molecular mechanisms of angiogenesis :fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J* 9, 919-925.

- Fukuzawa, K., Emre, S., Senyuz, O., Acarli, K., Schwartz, M.E., Miller, C.M. (1995).** N-acetyl-L-cysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia. *Transplantation* 59, 6–9.
- Gamble, J.R, Drew, J., Trezise, L., Underwood, A., Parsons, M., Kasminkas, L., Rudge, J., Yancopoulos, G., Vadas, M. A. (2000).** Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent In vitro and targets cell junctions. *Circ Res* 87, 603-607.
- **Gamble, W.R., Durso, N.A., Fuller, R.W., Westergaard, C.K., Johnson, T.R., Sackett, L., Hamel E, H., Cardellina II, J.H., , Boyd, M. R. (1999).** Cytotoxic and tubulin-interactive hemiassterlins from *Auletta* sp. and *Siphonochalina* spp. sponges. *Bioorg Med Chem* 7, 1611-1615.
- García-Rocha, M., Bonay, P., Avila, J. (1996).** The antitumoral compound Kahalalide F acts on cell lysosomes. *Cancer Lett* 99, 43-50.
- Gautam, R., and Jachak, S.M. (2009).** Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev* 29(5), 767-820.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. (2005).** Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 55, 178-194.
- Ghosh, A.K., Hirasawa, N., Lee, Y.S., Kim, Y.S., Shin, K.H., Ryu, N., and Ohuchi, K. (2002).** Inhibition by acharan sulfate of angiogenesis in experimental inflammation models. *Br J Pharmacol* 137, 441-448.
- Giordano, F.J., Ping, P., McKirnan, M.D., Nozaki, S., DeMaria, A.N., Dillmann, W.H., Costello M. O., and Kirk, H. H. (1996).** Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nature Med* 2, 534-539.
- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S., Kozian, D., and Augustin, H. G. (1998).** Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 78(11), 1385-1394.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J. Osborne, B.A. (2000).** In *Kuby immunology*. New York, W.H. Freeman.

**Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980).** What should be called a lectin? *Nature*, 285-266.

**Gomot, A. (1998).** Biochemical composition of *Helix* snails; influence of genetic and physiological factors. *J Molluscan Studies* 64, 173-181.

**Gutteridge, J.M.C. (1995).** Lipid peroxidation and antioxidant as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 14, 1819–1828.

**Haddad, E.B., Underwood, S.L., Dabrowski, D., Birrell, M.A., McCluskie, K.,**

**Battram, C.H., Pecoraro, M., Foster, M.L., and Belvisi, M.G. (2002).** Critical role for T cells in Sephadex-induced airway inflammation: pharmacological and immunological characterization and molecular biomarker identification. *J Immunol* 168(6), 3004–3016.

**Hagar, H. H. (2004).** The protective effect of taurine against cyclosporine A–induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Lett* 15, 1335–1343.

**Hahn, W., Counter, C., Lundberg, C. M., Beijersbergen, A. S., Brooks, R.L., Weinberg, M. W. (1999).** Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 400, 464-468.

**Hanahan, D. (1997).** Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277, 48-50.

**Hanahan, D., Weinberg, R.A.(2000).** The hallmarks of cancer. *Cell*100, 57-70.

**Hatuikulipi, T.N., Kouachi, M., Bouchetob, L.E., and Naimi, D. (2016).** Preventive effect of *Helix aspersa* slime against experimentally chemo-induced colitis in rat. *Der Pharmacia Lettre* 8 (13), 200-206.

**Hellal, M. (2007).** Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : Synthèses et activités anti-cytokine. THESE Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I). Discipline : Chimie Organique. 324p.

**Helms, R.A. (2006).** Textbook of therapeutics: drug and disease management. XXXIV, s., [16] pl. : ill. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. p2780.

**Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., Deby, C., Franchimont, P., Emerit, I. (1992).** Active oxygen species, articular inflammation and cartilage damage. *EXS* 62, 308-322.

**Herlaar, E., Brown, Z. (1999).** p38 MAP signaling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 5, 439-447.

**Herrera, J.L. (1993).** Abnormal liver enzyme levels. *The spectrum of causes.* *Postgraduate Medicine* 93(2), 113-116.

**Hirschi, K.K., and D'Amore, P.A. (1996).** Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32, 687-698.

**Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. (1999).** Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994-1998.

**Hosford, D., and Braquet, P. (1990).** The potential role of platelet activating factor in shock ischemia. *J Crit Care* 5, 115-136.

**Jain, R. K. (2003).** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9, 685-693.

**Jeong, J., Toida, T., Muneta, Y., Kosiishi, I., Imanari, T., Linhardt, R.J., Choi, H.S., Wu, S.J., and Kim, Y.S. (2001).** Localization and characterization of chondroitin sulfate in the body of the giant African snail *Achatina fulica*. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol* 130, 513-519.

**Kam, C.M., Hudig, D., Powers, J.C. (2000).** Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 307-323.

**Karp, G. (2010).** In *Biologie cellulaire et moléculaire*. De Boeck Université 3<sup>e</sup> édition. ISBN : 9782804160111. 810p.

**Kaya, H., Koc, A., Sogut, S., Duru, M., Yilmaz, R., Uz, E., and Durgut, R. (2008).** The protective effect of *N*-acetylcysteine against cyclosporine A-induced hepatotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 28, 15-20.

**Kerbel, S. R. (2000).** Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 21,505-515.

**Khalil, A., (1997).** L'effet du traitement immunosuppresseur sur la circulation coronaire. Université de Montréal. Thèse en Pathologie. 195p.

**Kierszenbaum, A.L. (2002).** In *Histologie Cellulaire et Moléculaire, une introduction à l'anatomie pathologie*. 1<sup>e</sup> édition. De Boeck. ISBN : 9782804149109. 618p.

**Kim, H.S, Lee, Y.H., Lee, Y.R., Sun-A, I., Lee, J.K., Kim, Y.S., Sim, J.S, Choi, H.S., and Lee, C.K. (2007).** Activation of professional antigen presenting cells by acharan sulfate isolated from giant african snail, *Achatina fulica*. *Arch Pharmacol Res* 30, 866-870.

**Kim, S.Y., Jo, Y.Y., Chang, I.M., Toida, T., Parks, Y., Linhardt, R.J. (1996).** A new glycosaminoglycan from the giant African snail *Achatina fulica* *J Biol Chem* 271, 11750-11755.

**Kindt, T., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., Kuby, J. (2007).** In *Kuby Immunology*. 6e edition W. H. Freeman, 574 p.

**Kirschvink, N., De Moffarts, B., Lekeux, P. (2008).** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The veterinary Journal*. 177,178-191.

**Klune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R., and Tsung, A. (2008).** HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 14, 476-484.

**Krammer, P. H. (2000).** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.

**Lamm, D.L., DeHaven, J.L., Riggs, D.R. (2000).** Keyhole limpet hemocyanin for carcinoma in situ of the bladder cancer: Laboratory and clinical studies. *Eur. Urol* 37,41-44.

**Lee, A., and Langer, R. (1983).** Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 221, 1185-1187.

**Lee, Y.S, Yang, H.O, Shin, K.H, Choi, H.S, Jung, S.H, Kim, Y.M, Oh, D.K., Linhardt, R.J., and Yeong Shik Kim, Y.S. (2003).** Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur J Pharmacol* 465, 191-198.

**Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.-P., Thérond, P., Torreilles. J. (1998).** Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique* 3, 305- 319.

**Loganzo, F., Discafani, C.M., Annable, T., Beyer, C., Musto, S., Hari, M., et al. (2003).** HTI-286. A synthetic analogue of the tripeptide hemiassterlin, is a potent antimicrotubule agent that circumvents P-glycoprotein-mediated resistance *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 63,1838-1845.

**Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N. Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1997).** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 277, 55-60.

**Mak, T., and Saunders, M. (2004).** The Immune Response. Basic abd clinical principles. Academic Press. 1e édition. 1216p.

**Makino, N. (1985).** An oxygenation-linked dye binding to *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Eur. J. Biochem* 146, 563-569.

**Malaker, A, Shah, A.I.A. (2013).** Therapeutic potency of anticancer peptides derived from marine organism. *Int J Eng Appl Sci* 2,35-65.

**Mannic, T. (2009).** VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer : Phosphorylation et clivage. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier Grenoble 1. 190p.

**Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008).** Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.

**Markl, J. (2013).** Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1834(9), 1840-1852.

**Martín-Algarra, S., Espinosa, E., Rubió, J., López, J.J.L., Manzano, J.L., Carrión, L.A., Plazaola, A., Tanovic, A., and Paz-Ares, L. (2009).** Phase II study of weekly Kahalalide F in patients with advanced malignant melanoma. *Eur J Cancer* 45, 732-735.

**Mastrangelo, A.M., Jeitner, T.M., Eaton, J.W. (1998).** Oleic acid increases cell surface expression and activity of CD11b on human neutrophils. *J Immunol* 161(8), 4268–4275.

**Mathy-Hartert, M., Damas, P., Nys, M., Debydupont, G., Cannivet, J.L., Ledoux, D., Lamy, M. (2000).** Nitrotyrosine proteins in bronchoalveolar lavage fluid of intensive care patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia. *Eur Respir J* 16, 296-301.

**Matsuura, Y., Yabu, T., Shiba, H., Moritomo, T., Nakanishi, T. (2014).** Identification of a novel fish granzyme involved in cell-mediated immunity. *Dev Comp Immunol* 46, 499-507.

**Matsuura, Y., Yabu, T., Shiba, H., Moritomo, T., Nakanishi, T. (2016).** Purification and characterization of a fish granzymeA involved in cell-mediated immunity. *Dev Comp Immunol* 60, 33-40.

**Mayer, A.M., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G., Fusetani, N. (2011).** Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153(2), 191-222.

**McKay, L.I, Cidlowski, J. (1999).** Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- $\kappa$ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Rev* 2, 435-459.

**Medzhitov, R. (2001).** Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews* 1, 135-145.

**Medzhitov, R., and Janeway, C.A.Jr. (1997).** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.

**Metges, J.P., Volant, A., Pera, M., Robaszekiewicz, M. (2005).** Combattre la néoangiogenèse tumorale, attaquer les voies d'activation du cancer Les nouvelles voies dans la prise en charge des cancers digestifs. *Méthodes thérapeutiques* 11, 325-336.

**Millet, A. (2014).** Rôle pro-inflammatoire et immunomodulateur de la protéinase 3 membranaire exprimée au cours de l'apoptose : implications dans la granulomatose avec Polyangéite. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale Biologie et Biotechnologie, Université Paris Descartes. 150 p.

**Monot, M. (2015).** Mécanismes intracellulaires de la transformation médiée par l'enveloppe de JSRV. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1. 113p.

**Morita, H., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K. (1999).** immunosuppressive effect of leucotriène B(4) receptor antagonist *in vitro*. *Biochem biophys Res Commun* 264, 321-326.

**Murell, G.A., Dolan, M.M., Jang, D., Szabo, C., Warren, R.F., Hannafin, J.A. (1996).** Nitric oxide: an important articular free radical. *J Bone Joint Surg Am* 78, 265-272.

**Murphy, G., and Willenbrock, F. (1995).** Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 248, 496–510.

**Nagar, J.K., Patel, P.P., Mohapatra, J.N., Sharma, M.M., Pandya, G.M., Umar, M.M., Chatterjee, A.A., Deshpande, S.S., Jain, M.R., Soni, H.M. (2015).** Differential effects of dexamethasone and rosiglitazone in a sephadex-induced model of lung inflammation in rats: possible role of tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Indian J Pharmacol* 47(2),153-159.

**Nagase, H. (1997).** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378, 151–160.

**Namovic, M.T., Walsh, R.E., Goodfellow, C., Harris, R.R., Carter, G.W., Bell, R.L. (1996).** Pharmacological modulation of eosinophil influx into the lungs of Brown Norway rats. *Eur J Pharmacol* 315(1), 81–88.

**Navarro-Alarcon, M., and Cabrera-Vique, C. (2008).** Selenium in food and the human body. *Science of the total environment*, 400 (1-3), 114-141.

**Odaka, C., Sanders, M.L., Crews, P. (2000).** Jasplakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a caspase-3-like protease-dependent pathway. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 947-952.

**Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979).** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction 95(2), 351-358.

**Oppenheim, J. J., Tewary, P., De la Rosa, G., and Yang, D. (2007).** Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol* 601, 185-194.

**Ortega-Go´mez1, A., Perretti, M., Soehnlein, O. (2013).** Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 5, 661–674.

**Overall, C.M., and Kleifield, O. (2006).** Tumor microenvironment-opinion: validating matrix metalloproteinases as drug target and anti-target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6, 227-39.

**Papetti, M., and Herman, I.M. (2002).** Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5), 947-970.

**Partanen, J., Vainikka, S., Alitalo, K. (1993).** Structural and functional specificity of FGF receptors. *Phil Trans R Soc Lond* 340, 297-303.

**Pasquet, V. (2011).** Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Thèse de Doctorat. École Doctorale Sciences pour l'Environnement Gay Lussac, Université de la Rochelle. 225p.

**Patan, S. (1998).** TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 56, 1-21.

**Pelletier, L. (2011).** Biologie Cellulaire de l'angiogénèse. UE2 Biologie Cellulaire. Université Josef Fourier de Grenoble.

**Pepper, J. P., Baumann, M. H., Ayestas, M. and Rothman, R. B. (2001).** Inhibition of MAO-A fails to alter cocaine-induced increases in extracellular dopamine and norepinephrine in rat nucleus accumbens. *Brain Res Mol Brain Res* 87, 184-189.

**Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., Geuze, H.J. (1991).** Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173, 1099-1109.

**Pietrzyk, A.J., Bujacz, A., Mak, P., Potempa, B., Niedziela, T. (2015).** Structural studies of *Helix aspersa* agglutinin complexed with GalNAc:A lectin that serves as a diagnostic tool. *International Journal of Biological Macromolecules* 81, 1059–1068.

**Pirame, S.S.L. (2003).** Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) : Reproduction expérimentale. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. 99 p.

**Pollard, J.W. (2004).** Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.

**Poncet, J. (1999).** The dolastatins, a family of promising antineoplastic agents. *Curr Pharm* 5, 139-162.

**Ramana, C.V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H., Stark, GR. (2000).** Complex role of stat 1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19, 2619-2627.

**Rando, T.A. (2007).** The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction. *Cell*. 129, 1239-1243.

**Rang, H.P., and Dale, M.M. (2012).** Rang and Dale's pharmacology: Edinburgh : Elsevier Churchill Livingstone. 8e edition. 776p.

**Rannou, F., François, M., Corvol M.T., Berenbaum, F. (2005).** Dégradation du cartilage et polyarthrite rhumatoïde, Postlumbar puncture arachnoiditis. The need for directed questioning. *Revue du Rhumatisme* 72, 322 - 330

**Rezzani, R. (2004).** Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog Histochem Cytochem* 39, 85–128.

**Riggs, D., Jackson, B., Vona-Davis, L., McFadden, D. (2002).** *In vitro* anticancer effects of a novel immunostimulant keyhole limpet hemocyanin. *J. surgery research* 108, 279-284.

**Risau, W. (1997).** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626), 671-674.

**Robin, J. (2000).** Une solution naturelle pour traiter l'angiogénèse et les pathologies dépendantes. *Nutranews science, nutrition, prévention et santé*.

**Roux, S., and Lambert-Comeau, P. (2005).** CD95's deadly mission in the immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 42.

**Roy, J.S. (2007).** Rôle de mmp-9 dans la métastase du lymphome T non Hodgkinien. Mémoire pour l'obtention de grade de Maître en Sciences en virologie et immunologie. Université du Québec. 103p.

**Rudiger, H. (1993).** Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology*. Springer, Berlin, pp. 31-46.

**Russo-Marie, F., Peltier, A., Polla, B.S. (1998).** *L'inflammation*. John Libbey Eurotext. 565 p.

**Sanchez, D., Ganfomina, M.D., Gutierrez, G., Bastani, M.J. (1998).** Molecular characterization and phylogenetic relationship of a protein with potential oxygen-binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects. *Mol Biol Evol* 15, 415-426.

**Schmidmaier, R., Baumann, P. (2008).** Anti-adhesion evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Curr Med Chem* 15, 978-990.

**Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G. (2003).** La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét* 147, 79-93

**Sethi, G., Shanmugam M.K., Ramachandran, L., Kumar A. P., And Tergaonkar V. (2012).** Multifaceted link between cancer and inflammation. *Biosci Rep* 32, 1–15.

**Sgadari, C., Angiolillo, A. L. and Tosato, G. (1996).** Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 87, 3877-3882.

**Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. (1995).** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.

**Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992).** Vascular Endothelial Growth-Factor Induced by Hypoxia May Mediate Hypoxia-Initiated Angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.

**Sibilia, J. (2007).** Comment définir et classer les maladies inflammatoires. *Revue du Rhumatisme* 74, 714-725.

**St Clair, E.W. (1998).** Nitric oxide: friend or foe in arthritis. *J Rheumatol* 25, 1451-1453.

**Stetler-Stevenson, W.G. (1999).** Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103, 1237-1241.

**Stichtenoth, D.O., and Frolic, J.C. (1998).** Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 37, 246-257.

**Stora D. (2010).** Pharmacologie B.P. Classe pharmacologiques (4<sup>e</sup> édition). Porphyre. France Wolters Kluwer. ISBN: 2915585148. 425p.

**St-Pierre, Y., Couillard, J., Van Tensch, C. (2004).** Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 8, 473-89.

**Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D.M., Zhou, H., Oldmixon, E.H., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1998).** Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282, 468-471.

**Suter, P.M., Suter, S., Girardin, E., Roux-Lombard, P., Grau, G.E., Dayer, J.M. (1992).** High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 145, 1016-1022.

**Tedesco, D., and Haragsim, L. (2012).** Cyclosporine: a review. *J Transplant* p 2012, 230386.

**Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M., and Yancopoulos, G. D. (2000).** Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6, 460-463.

**Toader-W, A., and 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* 66, 1-2.

**Trapani, J.A., Smyth, M.J. (2002).** Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol* 2, 735-747

**Tsan, M.F., and Gao, B. (2009).** Heat shock proteins and immune system. In *J Leukoc Biol* 85, 905-910.

**Tzianabos, A.O. (2000).** Polysaccharide immunomodulation as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 13, 523-533.

**Van Holde, K.E., and Miller, K.I. (1995).** Hemocyanins. *Adv. Protein Chem* 47, 1-81.

**Vasta, G.R. (1992).** Invertebrate lectins: Distribution, synthesis, molecular biology and function. In Allen, H.J. and Kisailus, E.C. (eds), *Glycoconjugates, Composition, Structure and Function*. Marcel Dekker, New York. 250p.

**Vermerris, W., & Nicholson. R. (2006).** Phenolic compound biochemistry. USA: Springer Nueva york, EEUU 316. ISBN: 978-1-4020-5163-0 .151-153.

**Weidner, N, Folkman, J., Pozza, F, Bevilacqua, P., Allred, E.N., Moore, D.H., Meli, S., and Gasparini, G. (1992).** Tumor angiogenesis : a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84, 1875-1887.

**Winterbourn, C.C., and Brennan, S.O. (1997).** Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J* 326, 87-92.

**Witzenbichler, B., Maisonpierre, P.C, Jones, P., Yancopoulos, G.D., Isner, J.M. (1998).** Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 273, 18514-18521.

**Woetmann, A., Lovato P., Eriksen, K., .W, Krejsgaard T., Labuda T., Zhang , Q., Mathiesen, A. M., Geisler, C., Svejgaard, A., Wasik, M. A., Ødum, N. (2007).** Nonmalignant T cells stimulate growth of T-cell lymphoma cells in the presence of bacterial toxins. *Blood* 109(8), 3325–3332.

**Yokota, J. (2000).** Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21(3), 497-503.

**Zaafour, M. (2014).** Étude écophysiologique de la reproduction de l’escargot terrestre Petit-Gris (*Helix aspersa aspersa*, Gastropoda: Stylommatophora; Helicidae) dans la région Nord-Est d’Annaba – Algérie. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar – Annaba. 39-40.

**Zetter, B.R. (1998).** Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 49, 407-424.

**Zhang, G.Q., Sun, J., Wang, H.X., and Ng, T.B. (2009).** A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. *Acta Biochimica Polonica* 56 (3), 415–421.

**Zhipeng, L., Jinfeng, H., Mingna, S., Haijie J., Shifeng, C., Gang, L., Naihong, C. (2012).** Anti-inflammatory effect of IMMLG5521, a coumarin derivative, on Sephadex-induced lung inflammation in rats. *International Immunopharmacology* 14, 145–149.

**Zuker, S., and Vacira, J. (2004).** Role of matrix métalloprotéinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer metastasis Rev* 23, 101-117.

### Webographie:

- 1- Anticancéreux : les points essentiels. Disponible sur : <http://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anticancereux-les-points-essentiels> (consulté le 28/11/2016).
- 2- ATCC (American Type Culture Collection) disponible sur : <https://www.atcc.org/en.aspx> (consulté le 28/11/2016).
- 3- Granzyme pathway. Affymetrix. eBioscience. Disponible sur : <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/granzyme-pathway.htm> (consulté le 28/11/16)

Bien que le domaine de la biotechnologie ait connu ces dernières années un développement extraordinaire, les thérapeutiques restent insuffisantes et peuvent provoquer des effets secondaires chez les patients. *Helix aspersa* est un mollusque terrestre très répandu dans les pays méditerranéens et fait partie du patrimoine culinaire de plusieurs populations. Il possède plusieurs effets thérapeutiques connus depuis des siècles. L'une des principales perspectives de notre étude est l'évaluation des effets anti-inflammatoire, anti-tumoral et anti-angiogénique de ce gastéropode. Trois extraits ont été préparés à partir de la chair d'*Helix aspersa* : extrait aqueux, hydroalcoolique et organique. L'activité anti-inflammatoire des extraits a été évaluée *in vivo* en mesurant le taux des globules blancs, en évaluant l'activité des myéloperoxydases et en analysant l'histologie du poumon. L'analyse des résultats a montré que les extraits avaient une activité anti-inflammatoire en diminuant le taux des leucocytes, en protégeant le tissu pulmonaire, et en modulant l'activité des neutrophiles. L'activité antiproliférative des extraits a été évaluée par le bleu trypan et par le test MTT *in vitro*, sur plusieurs lignées cellulaires MK2, A549, HUH7, K562, HUT-78 et SeAx. La condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire ont été évaluées par le test Hoechst dans les lignées HUT-78 et SeAx, en présence de l'extrait aqueux. Les extraits aqueux et hydroalcoolique avaient une activité antiproliférative contre les lignées tumorales HUT-78 et SeAx. L'extrait aqueux a induit une apoptose dans les cellules HUT-78 et SeAx. Les extraits hydroalcoolique et organique avaient une activité antiproliférative sur la lignée tumorale HUH7. Les trois extraits n'étaient pas toxiques sur la lignée cellulaire normale MK2. L'expression d'une métalloprotéinase impliquée dans l'angiogénèse «MMP-9» dans les deux lignées HUT-78 et SeAx incubées avec les extraits aqueux et hydroalcoolique, a également été appréciée par la méthode de zymographie. Les deux extraits n'avaient aucun effet sur la production de cette protéase. À la fin, nous avons réalisé une extraction des protéines solubles à partir de lyophilisat de la chair de notre escargot et nous avons fractionné cet extrait par chromatographie échangeuse d'anions. L'activité protéolytique, en utilisant des substrats de synthèse et des inhibiteurs de protéases ainsi que l'activité antiproliférative des différentes fractions obtenues ont été mesurées. Certaines fractions contiennent des protéases et avaient une activité antiproliférative. Cependant, d'autres n'en contiennent pas mais avaient un effet toxique sur d'autres les lignées tumorales. On a conclu que les extraits aqueux, hydroalcoolique et organique d'*Helix aspersa* avaient un effet anti-inflammatoire, un effet anti-tumoral n'avaient pas un effet antiangiogénique (sur la production de la MMP-9).

**Mots clés :** *Helix aspersa*, extraits, biomolécules, réaction inflammatoire, cellules tumorales, protéase, invasion tumoral.

Although the field of biotechnology has developed extraordinarily in recent years, therapies remain ineffective and can cause side effects in patients, which is why the laboratories have turned to the search for new natural products. *Helix aspersa* is a terrestrial mollusk that is widespread in Mediterranean countries and is part of the food habitude. It is an important source of protein and mineral salts and has several therapeutic effects known for centuries. One of the main prospects of our study is the evaluation of the anti-inflammatory, anti-tumor and anti-angiogenic effects. Three extracts were prepared using solvents with different polarity: an aqueous extract, an hydroalcoholic extract and an organic extract. Then, a model of acute pulmonary inflammation was developed to evaluate *in vivo* the anti-inflammatory activity of extracts by measuring total white blood cells and white blood cells in bronchoalveolar fluid, myeloperoxidase activity and analyzing the histology of pulmonary tissue. Analysis of the results showed that the extracts had anti-inflammatory activity by decreasing the total leukocyte count in blood and in bronchoalveolar fluid, protecting the pulmonary tissue by modulating neutrophil activity and decreasing protein concentration in bronchoalveolar fluid. The antiproliferative activity of the extracts was evaluated by trypan blue and the MTT test on several cell lines: MK2, A549, HUH7, K562, HUT-78 and SeAx. The chromatin condensation and nuclear fragmentation were evaluated by the Hoechst test in the HUT-78 and SeAx tumor cell line stimulated by the aqueous extract. The aqueous and hydroalcoholic extracts had antiproliferative activity against the HUT-78 and SeAx lines. The aqueous extract induced apoptosis in HUT-78 cells. The hydroalcoholic and organic extracts had an antiproliferative activity on the HUH7 line. The three extracts were not toxic on the MK2 normal cell line. The antiangiogenic effect was evaluated by measuring the expression of MMP-9 in the two HUT-78 and SeAx lines stimulated in the presence of the aqueous and hydroalcoholic extracts using was the zymography method. The aqueous and hydroalcoholic extracts had no effect on the production of MMP-9. At the end, we extracted the soluble proteins from meat lyophilized and we fractionated the extracts by anions exchange chromatography. The proteolytic activity using synthetic substrates and protease inhibitors as well as the antiproliferative activity of the different fractions obtained were measured. One of the fractions contains proteases and has antiproliferative activity against the K562 liquid line. Nevertheless, other contained no enzymes and had a toxic effect on the matrix tumor lines A549 and HUH7. It was concluded that the aqueous, hydroalcoholic and organic extracts of *Helix aspersa* had an anti-inflammatory and an anti-tumor effects, but did not have an anti-angiogenic effect (on the expression of MMP-9).

**Keywords:** *Helix aspersa*, extracts, biomolecules, inflammatory reaction, tumor cells, protease, tumor invasion.

على الرغم من ان مجال البيوتكنولوجيا قد تطور بشكل هائل في السنوات الأخيرة، الى ان العلاجات المتوصل اليها غير فعالة الى جانب انها قد تسبب تأثيرات جانبية لدى المرضى، هذا ما جعل توجيه الابحاث نحو الجزيئات الطبيعية المستخلصة من الكائنات الحية. الحلزون *Helix aspersa* هو من الرخويات الأرضية المنتشرة على نطاق واسع في بلدان البحر الأبيض المتوسط، بالإضافة لكونه من بين الاطباق المشهورة و المفضلة لكثير من شعوبه. يعتبر هذا الرخوي مصدر هام للبروتين والمعادن وله العديد من الاستعمالات العلاجية المعروفة منذ قرون. من بين الاهداف الرئيسية لدراستنا هو تقييم آثارمستخلصات الحلزون ضد الالتهابات، ضد اللاورام وقدرتها على تكوين الاوعية الدموية. في دراستنا هذه تم تحضير ثلاثة مستخلصات من قدم الحزون ، باستخدام مذيبات ذات درجات قطبية مختلفة: المستخلص المائي، مستخلص هيدروكولي مستخلص عضوي. ثم تم تطوير نموذج من التهاب الحاد الرئوي لتقييم نشاط المستخلصات المضادة للالتهابات عن طريق قياس مستوى مجموع خلايا الدم البيضاء في الدم و في السائل الموجود في القصبات و الاسناخ الرئوية ، و على نشاط انزيم MPO و من خلال دراسة مقاطع نسيجية رئوية. وأظهر تحليل النتائج أن المستخلصات الثلاثة كان لها نشاط مضاد للالتهابات عن طريق خفض معدل مجموع الكريات البيضاء في الدم وفي السائل القصيبي السنخي ، وحماية الأنسجة الرئوية، عن طريق خفض نشاط الانزيم ميلوبروكسيداز وتناقص تركيز البروتين في السائل القصيبي السنخي. بعد ذلك، تم تقييم تأثير المستخلصات على تكاثر الخلايا الورمية عن طريق الملون الأزرق التريبان والفحص MTT في الخلايا MK2، A549، HUH7، K562، HUT-78، و SeAx . تم تقييم تكثف خيوط الكروماتين و تجزئة النواة باستعمال ملون نووي Hoechst في الخلايا HUT-78 و SeAx المحضونة مع المستخلص المائي. كان المستخلصات المائية وهيدلروكولي نشاط مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية HUT-78 و SeAx. المستخلص المائي يحث موت الخلايا المبرمج في الخلايا HUT-78 و SeAx . وقد كبحت المستخلصات الكحولية والعضوية والمائية تكاثر الخلايا السرطانية المستعملة في الدراسة وكانت غير سامة على الخلايا العادية MK2. تم تقييم التعبير عن MMP-9 في HUT-78 و SeAx المحفزة في وجود مستخلص المائي والهيدروكولي، بتقنية zymography . ولم يكن للمستخلصات المائية ومائية كحولية أي تأثير على إنتاج MMP-9 . في النهاية، أجرينا استخراج البروتين القابلة للذوبان من قدم الحلزون (النسيج العضلي) وقمنا بفصل الجزيئات عن طريق الفصل الكروماتوغرافي الأيونوني. تم قياس النشاط الانزيمي باستخدام ركائز الاصطناعية ومثبطات الأنزيم البروتيني، وكذلك النشاط مضاد تكاثر الخلايا الورمية لمختلف الاجزاء التي المتحصل عليه. جزء من الاجزاء يحتوي على البروتين مع تأثير مضاد للاورام ذات اصل سائل وجزء آخر لا تحتوي على انزيمات لكن كان لها تأثير ضد تكاثر الخلايا السرطانية النسيجية. استخلصنا من خلال اباحتنا إلى أن مستخلصات الحلزون المائية، المائية كحولية والعضوية كان له تأثير مضاد الالتهابات، تأثير مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية ولم يكن لها اي تأثير ضد انتاج البروتين التي تلعب دور في غزو الخلايا السرطانية للانسجة السليمة.

كلمات السر: هيليكس اسپرسا، مستخلصات، الجزيئات الطبيعية، تفاعل الالتهابي، خلايا سرطانية، بروتياز، غزو الورمي.

**Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa*  
(aqueux, hydro alcoolique et organique) :  
Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et anti-angiogénique**

**Résumé :**

Bien que le domaine de la biotechnologie ait connu ces dernières années un développement extraordinaire, les thérapeutiques restent insuffisantes et peuvent provoquer des effets secondaires chez les patients. *Helix aspersa* est un mollusque terrestre très répandu dans les pays méditerranéens et fait partie du patrimoine culinaire de plusieurs populations. Il possède plusieurs effets thérapeutiques connus depuis des siècles. L'une des principales perspectives de notre étude est l'évaluation des effets anti-inflammatoire, anti-tumoral et anti-angiogénique de ce gastéropode. Trois extraits ont été préparés à partir de la chair d'*Helix aspersa* : extrait aqueux, hydroalcoolique et organique. L'activité anti-inflammatoire des extraits a été évaluée *in vivo* en mesurant le taux des globules blancs, en évaluant l'activité des myéloperoxydases et en analysant l'histologie du poumon. L'analyse des résultats a montré que les extraits avaient une activité anti-inflammatoire en diminuant le taux des leucocytes, en protégeant le tissu pulmonaire, et en modulant l'activité des neutrophiles. L'activité antiproliférative des extraits a été évaluée par le bleu trypan et par le test MTT *in vitro*, sur plusieurs lignées cellulaires MK2, A549, HUH7, K562, HUT-78 et SeAx. La condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire ont été évaluées par le test Hoechst dans les lignées HUT-78 et SeAx, en présence de l'extrait aqueux. Les extraits aqueux et hydroalcoolique avaient une activité antiproliférative contre les lignées tumorales HUT-78 et SeAx. L'extrait aqueux a induit une apoptose dans les cellules HUT-78 et SeAx. Les extraits hydroalcoolique et organique avaient une activité antiproliférative sur la lignée tumorale HUH7. Les trois extraits n'étaient pas toxiques sur la lignée cellulaire normale MK2. L'expression d'une métalloprotéase impliquée dans l'angiogénèse «MMP-9» dans les deux lignées HUT-78 et SeAx incubées avec les extraits aqueux et hydroalcoolique, a également été appréciée par la méthode de zymographie. Les deux extraits n'avaient aucun effet sur la production de cette protéase. À la fin, nous avons réalisé une extraction des protéines solubles à partir de lyophilisat de la chair de notre escargot et nous avons fractionné cet extrait par chromatographie échangeuse d'anions. L'activité protéolytique, en utilisant des substrats de synthèse et des inhibiteurs de protéases ainsi que l'activité antiproliférative des différentes fractions obtenues ont été mesurées. Certaines fractions contiennent des protéases et avaient une activité antiproliférative. Cependant, d'autres n'en contiennent pas mais avaient un effet toxique sur d'autres les lignées tumorales. On a conclu que les extraits aqueux, hydroalcoolique et organique d'*Helix aspersa* avaient un effet anti-inflammatoire, un effet anti-tumoral n'avaient pas un effet antiangiogénique (sur la production de la MMP-9).

**Mots clés :** *Helix aspersa*, extraits, biomolécules, réaction inflammatoire, cellules tumorales, protéase, invasion tumoral.

**Membres du jury :**

Présidente : Mme TEBIBEL Soraya

Directrice de thèse : Mme NAIMI Dalila

Professeur, U. des frères Mentouri Constantine.

Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie  
Taoufik KHAZNADAR Constantine.

Examineurs :

Mr AZARKAN Mohamed

Mr ZELLAGUI Ammar

Professeur, Faculté de médecine, U. Libre de Bruxelles.

Professeur, U. Larbi Ben Mhidi, Oum el Bouaghi.

Mr BOUDDAH A. Nacer

Mme El OUAR Ibtissème

Professeur Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie  
Taoufik KHAZNADAR.Maitre de conférences A U. des frères Mentouri  
Constantine.