

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BENAHMED IMANE

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : NUTRITION ET PATHOLOGIE

THÈME

Propriétés biologiques *d'Helix aspersa muller.*

Soutenue publiquement le 26/06/2023

DEVANT LE JURY

Présidente	Mme. SIDHOUM-RACHIDI Nadra	Grade M.C.A	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. YAHLA Imène	Grade M.C.A	U. Mostaganem
Examineur	Mr. BENAMEUR Qada	Grade M.C.A	U. Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS.)



Remerciements

Je remercie, tout d'abord dieu le tout puissant de nous avoir donné la persévérance et l'obstination de parcourir notre chemin scientifique.

*Je voudrais témoigner ma reconnaissance à **Mme YAHLA Imène** pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses encouragements durant la réalisation de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier les membres du jury **Mr BENAMEUR Qada** et **Mme SIDHOUM Nadra** d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier notre directeur de laboratoire **LMBAFS**, le **Pr RIAZI Ali**, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon mémoire dans sans laboratoire.*

*Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire, pour leur aide et leur disponibilité surtout **Mme D. HAMED**.*

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin durant l'élaboration de ce travail.





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail...

A ma très chère mère

Qui représente pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi

A mon père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement, et le respect que j'ai toujours eu pour lui rien au monde se vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices pour mon éducation et ma formation

A mes très chères sœurs et mon frère

Ismail, Amina, Khadîdja

Je leur souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite. J'exprime ainsi mes sentiments d'amour

A mon fiancé

Miloud

A mes amies

Fatima, Hanan, Assia, Yakout, Fella, Kawter, Zoulikha, Naziha



Résumé

Résumé

L'objectif du présent travail consiste à étudier les pouvoirs antimicrobiens, antioxydant, et anti-inflammatoire de mucus de l'escargot *Helix aspersamuller* provenant de la région de Mostaganem Algérie. L'activité antimicrobienne a été testée vis à vis de 07 microorganismes pathogènes : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, et *Salmonella typhi* ATCC 6539. Les résultats de l'activité antibactérienne ont révélé les diamètres suivants par ordre décroissant, avec *Candida albicans* ATCC 10231 (09 ± 00.00 mm), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATC 33862, *Salmonella typhi* ATCC 6539 (08 ± 00.00 mm). Aucune activité antimicrobienne n'a été noté vis-à-vis des souches *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Escherichia coli* ATCC 25922. Les résultats de l'activité antioxydante confirment que le mucus de l'escargot *Helix aspersamullera* une activité antioxydantprononcée avec un $IC_{50} = 431$ $\mu\text{g/ml}$ et un pourcentage d'inhibition du DPPH de 57.5%. En outre, les résultats de l'activité anti-inflammatoire montrent que le mucus d'escargot *Hélix aspersa muller* est capable de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs trouvés dans le mucus. Ces résultats suggèrent l'éventualité de l'utilisation de mucus d'escargot *Helix aspersa muller* comme traitement vis-à-vis de certaines infections d'origine bactériennes voir même certaines mycoses, traitement anti-inflammatoire et même antioxydant.

Mots clé : Mucus, *Helix aspersamuller*, activitéantibactérienne, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante,

Abstract

The objective of the present study is to explore the antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties of the mucus of the snail *Helix aspersa muller* from the region of Mostaganem, Algeria. The antimicrobial activity was tested against 07 pathogenic microorganisms: *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, and *Salmonella typhi* ATCC 6539. The antibacterial activity results revealed the following diameters in descending order, with *Candida albicans* ATCC 10231 (09 ± 00.00 mm), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Salmonella typhi* ATCC 6539 (08 ± 00.00 mm). No antimicrobial activity was noted against strains *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Escherichia coli* ATCC 25922. Antioxidant activity results confirm that mucus from the snail *Helix aspersa muller* has a pronounced antioxidant activity with an $IC_{50} = 431 \mu\text{g/ml}$ and a percentage inhibition of DPPH of 57.5%. In addition, anti-inflammatory activity results show that *Helix aspersa muller* snail mucus is able to control autoantigen production through inhibition of protein denaturation. The denaturation inhibitory activity of BSA can be attributed to the presence of different bioactive compounds found in mucus. These results suggest the possibility of using *Helix aspersa muller* snail mucus as a treatment for certain infections of bacterial origin or even certain fungal infections, anti-inflammatory and even antioxidant treatment.

Keywords: Mucus, *Helix aspersa muller*, antibacterial activity, anti-inflammatory activity, antioxidant activity,

Liste des abréviations

AO : agents oxydants.

ATCC: American Type Culture Collection.

B. cereus : *Bacillus cereus*.

Bcss : *Bacillus cereus sensu stricto*.

BN : bouillon nutritif.

Bt : *Bacillus thuringiensis*.

Ca : calcium.

CaCO₃ : carbonate de calcium.

CFU : colony forming unit.

CMC : Catégories majeures cliniques.

D.O : DissolvedOxygen.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

E. coli : *Escherichia coli*.

ERO : espèce réactive de l'oxygène.

G6PD : Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

H. aspersa : *Helix aspersa muller*.

H. pomatia : *Helix pomatia*.

HRBC : Homologous Red Blood Cell.

KDa : kilodaltons.

LMBAFS : laboratoire des microorganismes bénéfiques des aliments fonctionnels et de la santé.

MH : Mueller Hinton.

P. acnes : *Pseudomonas acnes*.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

PBS : tampon phosphate saline.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

S. épidermidis : *Staphylococcus épidermidis*.

SBA : sérum bovine albumine.

SHU : syndrome hémolytique et urémique.

Liste des tableaux et des figures

Liste des tableaux

Tableau 01 : Nature et Origine des différentes souches pathogènes utilisées.....	31
---	-----------

Liste des figures

Figure 01 : L'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	06
Figure 02 : Anatomie interne de l'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	07
Figure 03 : Distribution de l'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	08
Figure 04 : Morphologie de l'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	09
Figure 05 : Forme sénestre et dextre de Petit-gris.....	09
Figure 06 : La coquille de l'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	11
Figure 07 : Onde de contraction sur la face ventrale des pieds d'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	12
Figure 08 : Partie de la langue râpeuse de l'escargot <i>Helix aspersa muller</i> , la radula.....	13
Figure 09 : Alimentation de l'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	14
Figure 10 : <i>Bacillus cereus</i> vue microscope électronique.....	23
Figure 11 : <i>Bacillus subtilis</i>	24
Figure 12 : <i>Staphylococcus aureus</i> institut pasteur.....	25
Figure 13 : <i>Escherichia coli</i> institut pasteur.....	26
Figure 14 : <i>Salmonella typhi</i> en microscope a balayage, institut pasteur.....	26
Figure 15 : observation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique.....	27
Figure 16 : <i>Candida albicans</i>	28
Figure 17 : L'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	31
Figure 18 : L'élevage de l'escargot <i>Helix aspersa muller</i>	32
Figure 19 : Réactivation les souches.....	33
Figure 20 : Méthode des disques.....	33
Figure 21 : Le dosage de DPPH.....	35
Figure 22 : Prelevement sanguin.....	36
Figure 23 : Pouvoir antibactérienne de mucus d'escargot <i>Hélix aspersa muller</i> par la méthode de disque.....	39

Figure 24 : Diamètres d'inhibition du mucus vis-à-vis des souches testées en mm.....	40
Figure 25 : Pouvoir antibactérienne de mucus d'escargot <i>Helix aspersa muller</i> par la méthode de disque.	40
Figure 26 : Diamètres d'inhibition du mucus vis-à-vis des souches testées en mm.....	41
Figure 27 : Evaluation de pouvoir anti radicalaire par DPPH.....	42
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	43
Figure 29 : Le pourcentage d'hémolyse induite par la chaleur de déclofénac et mucus.....	44
Figure 30 : Pourcentage de la dénaturation des protéines.....	45

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur l’escargot Hélix aspersa Muller	
I.1 Etymologie du mot « escargot »	4
a. Terminologie	4
1) Taxonomie	5
2) Zoologie	5
I.2 Bio-écologie des gastéropodes	6
I.2.1. Description de la classe des gastéropodes	6
I.2.2 Classification des escargots	6
I.2.2.1 Hélix Aspersa Müller (Petit-gris) –Distribution géographique	7
I.2.2.2 Description morphologique d’Hélix Aspersa muller	8
I.2.3 Déplacement	12
I.2.4 Alimentation	13
I.2.5 Longévité	14
I.3 Le mucus de l’escargot Hélix aspersa muller	15
I.3.1 Les glandes sécrétrices du mucus	15
	16

a. Dans la région dorsale	
b. Dans la région ventrale (plante du pied)	16
c. Dans la zone transitoire	16
I.3.2 Composition de mucus ou la bave d'escargot	16
I.3.3 Les bienfaits de la bave d'escargot	17
a. L'action hydratante et nourrissante de la bave d'escargot	17
b. L'action régénérant de la bave d'escargot	18
c. L'action cicatrisante de la bave d'escargot	18
d. L'action purifiante de la bave d'escargot	18
e. L'action antioxydant	18
f. L'action exfoliante de la bave d'escargot	18
Chapitre II : Généralités sur la Toxinogénèse, L'activité Anti-inflammatoire et Antioxydant	
II.1. Description de certains microorganismes pathogènes.....	21
II.1.1. Physiologie	21
a. Les Bacillus cereus pathogènes	22
b. Pouvoir pathogène	22
1) Le syndrome diarrhéique	22
2) Le syndrome émétique	23
c. Bacillus subtilis	23
d. Staphylococcus aureus	24
e. Escherichia coli	25
f. Salmonella typhi	26
g. Pseudomonas aeruginosa	26

h. Candida albicans	27
II.2.Le stress oxydatif	28
II.3. L'activité anti-inflammatoire	29
Chapitre III : Matériels et Méthodes	
III.1.L'objectif de l'expérimentation	31
III.2.Matériel animal	31
III.3. Origines des souches testées	31
III.3.1. Milieux de culture et conditions d'incubation	32
III.4. Protocole expérimental	32
III.4.1. Méthode d'extraction du mucus de l'escargot	32
III.4.2. Activité antimicrobienne	32
a. Réactivation des souches pathogènes et ajustement de l'inoculum	33
b. Technique de diffusion en milieu solide (méthode de disques)	33
III.4.3. Activité antioxydant	34
a. Purification des fractions du mucus d'Helix spersa	34
b. Dosage du DPPH	34
III.4.4. Activité anti-inflammatoire	35
a. Méthode stabilisation des membranes HRBC	35
Chapitre IV : Résultats et Discussion	
IV.1. Activité antibactérienne du mucus d'Helix aspersa muller	39
IV.2. Etude de l'activité antioxydant	41
IV.2.1. Test de piégeage du radical libre DPPH	41
IV.2.2.Evaluation de l'IC50	42
IV.2.3. Acide ascorbique	43

IV.3. Activité anti-inflammatoire in vitro	43
IV.3.1. Test de stabilisation des membranes HRBC	43
IV.3.2. Test de la dénaturation des protéines	44
Conclusion	47
Références bibliographiques.	48
Annexes.	51

Introduction

Les escargots sont des Mollusques Gastéropodes terrestres, pulmonés, appartenant à l'ordre des Stylommatophores. *Helix aspersa* est un Gastéropode de la famille des Helicidae (Bonnet et al, 1990) C'est une espèce d'escargot comestible facile à récolter et très répandue en Algérie, surnommé le « Petit-gris ». Il vit principalement dans les jardins, les lieux cultivés, les friches, les haies. Son régime trophique caractérise un herbivore de type généraliste. La diversité des plantes dont il se nourrit en fait un consommateur important dans les biotopes dans lesquels il évolue (Baptiste et al, 2014).

Dans une édition de 1995 de L'Officine de Dorvault, ouvrage de référence pour le pharmacien, il est précisé que le limaçon ou colimaçon ou encore escargot (*Helix aspersa*) « contient un mucus abondant auquel, on attribuait, il n'y a pas encore longtemps, des propriétés médicinales » (Sophie. L, 2020).

Appelé familièrement bave, le mucus est une substance qui possède différents rôles : il permet l'adhérence de l'escargot *Helix aspersa* à son support (l'escargot, en effet, est capable de partir à l'ascension des vitres de nos maisons) et constitue un moyen de communication et de reconnaissance (une sorte de GPS escargotier). Ce mucus a fait l'objet d'un certain nombre de recherches scientifiques. Les travaux réalisés sur cette substance produite par les glandes salivaires du gastéropode démontrent sa variabilité en fonction des individus et en particulier en fonction de l'espèce considérée, mais également sa très grande richesse en eau.

Le mucus de l'escargot *Helix aspersa muller* contient entre 90 et 99,7 % d'eau selon les cas. L'analyse de la composition minérale témoigne de la présence de sodium (entre 0,6 et 1,7 g/L), de potassium (entre 0,2 et 0,8 g/L) et de magnésium (entre 0,4 et 1,5 g/L). Du point de vue composition en matière organique, nous ne retiendrons que les molécules mises, le plus souvent, en avant, par les sociétés cosmétiques commercialisant des produits à la bave d'escargot. L'allantoïne, un actif apaisant utilisé dans tous types de cosmétiques à destination des peaux sensibles ou sujettes au phénomène d'irritation, est présente à hauteur de 50 mg/L de mucus (*Helix aspersa*). L'acide glycolique, un alpha-hydroxy acide, très fréquemment retrouvé dans les produits anti-âge et dans les produits éclaircissants est présent à la concentration de 3,3 g/L (Sophie, 2020).

Concernant l'efficacité de ces cosmétiques formulés à base de bave d'escargot, il convient de parler chiffres. L'allantoïne est utilisée dans les domaines cosmétique et pharmaceutique à des doses allant de 0,5 à 1 % (c'est le cas par exemple dans la spécialité médicamenteuse Cicatryl). L'acide glycolique, quant à lui, est utilisé à des doses supérieures à 5 % si l'on souhaite réaliser des cosmétiques anti-âges. Un laboratoire qui désire mettre sur le marché un cosmétique renfermant 0,5 % d'allantoïne et 5 % d'acide glycolique devra donc réaliser la prouesse technique de faire rentrer 10 litres de mucus dans un conditionnement de 100 grammes (Sophie, 2020).

Des autres études sont en cours de réalisation pour déterminer d'autres propriétés médicinales d'*Helix aspersa muller* telle que les propriétés antibactérienne, antioxydant et anti-inflammatoire.

Dans ce contexte , l'objectif de notre travail consiste à évaluer les activités antibactériennes, anti-oxydante et anti-inflammatoire du mucus d'*Helix aspersa*.

**Chapitre I : Généralités sur l'escargot *Hélix aspersa*
*Muller***

Chapitre I : Généralités sur l'escargot *Hélix aspersa* Muller

I.1 Etymologie du mot « escargot »

a. Terminologie

Le terme escargot, du latin *scarabaeus* et du provençal *escaragol*, de Majorque (en Espagne), désigne un mollusque gastropode pulmoné terrestre, végétarien, caractérisé par sa tête munie de deux paires de tentacules, dont les plus longs portent les yeux, par sa longue sole ventrale (ou pied), par sa coquille en spirale globuleuse dont le sommet surplombe le flanc droit, enfin par son orifice pulmonaire dorsal (Abarrategui et al, 2006).

- **Une escargotière peut désigner** : un lieu où l'on stocke et nourrit des escargots, un plat spécial doté de petites alvéoles, dans lesquelles on place les escargots avant de les passer au four, ou encore, un amas de coquilles d'escargots dans un gisement préhistorique.
- **Un mollusque** (embranchement des *Mollusca*), du latin scientifique molluscum et du latin classique *mollusca*, noix à écorce molle, est un animal invertébré, à corps mou, comme un escargot, une huître, un poulpe.
- **Un gastéropode ou gastropode**, (classe des *Gastropoda*), du grec *gastêr*, ventre et pous, podos pied, est un mollusque rampant sur un large pied central musculueux, souvent pourvu d'une coquille dorsale spiralée et vivant dans les mers (*Buccin*), en eau douce (*Limnée*) ou dans les lieux humides (*Escargot, Limace*).
- **Un pulmoné** (sous-classe des *Pulmonata*) est un mollusque gastéropode terrestre ou en eau douce respirant par un poumon, tel que, l'Escargot, la Limace et la Limnée.
- **L'héliciculture**, du grec *Hélix*, spirale, est l'élevage des escargots comestibles.
- **La coquille**, du latin *Conchylum*, est une enveloppe dure, calcaire, constituant le squelette externe de la plupart des Mollusques et des Brachiopodes (*Brachiopoda*). Elle est sécrétée par une partie du tégument, le manteau.
- **Chez les mollusques**, le manteau (du latin *mantellum*, diminutif de *mantum*, manteau), est un repli du tégument qui recouvre la masse viscérale et dont la face externe sécrète souvent une coquille qui n'y reste pas adhérente.
- **L'escargotage** est la destruction des escargots dans les vergers ou les vignobles.
- **Hélix** ("*Hélice*" ou "*spirale*" en grec) est le nom générique d'un genre d'escargot devant son nom à sa coquille enroulée. Certains sont bien connus des gourmets comme l'Escargot de Bourgogne (*Hélix pomatia*) et le Petit-gris (*Hélix aspersa aspersa*).
- **Naissain** (du verbe naître) : jeune mollusque (escargots, huîtres ou moules) qui vient d'éclore (Shenody et al, 2020).

Chapitre I : Généralité sur l'escargot *Helix aspersa* (Muller).

Hélix aspersa aspersa, plus connu sous le nom commun du Petit-gris appelé communément en Algérie «**Z'gargou**» ou «**Boujaghlel**», « **Boujeghlelou** » es un escargot très répandu sur la façade méditerranéenne algérienne. Son aire de répartition séco-biogéographique s'étend à toute l'Afrique du Nord et en Europe. (L'espèce a été décrite par le zoologue danois Otto Friedrich Müller en 1774) (Shenody et al, 2020).

Le mot espagnol « caracol » est probablement à l'origine du mot français escargot, ainsi introduit en France via La Rochelle où les marins espagnols et portugais venaient se ravitailler. A cette appellation, il faut ajouter d'autres noms tels que : « *hélice* »(par référence, à la forme de sa coquille) « limaçon » et « colimaçon ».

On désigne également l'escargot différemment selon les régions ; le petit-gris s'appelle : « *hélice chagrine* », « *luma* » ou « *limât* », « *tapada* »(Provence), « *cagouille* » (Bordeaux - Charentes), « *carago* » (Marseille),«*luma* » (Poitou), « *cacalan* » (Provence), « *cantareu* » (Nice), « *casaraulau* » (Languedoc), « *casaulada* » (Roussillon).

L'origine du mot « *luma* » est probablement italienne (de Lumace) (Bonnet et al, 2019).

1) Taxonomie :

Cornu aspersum (Müller, 1774)

Nom de famille : *Hélicidae*

Nom du genre : *Cornu*

Espèce : *Cornu aspersum* (Muller, 1774)

Noms communs : Escargot de jardin commun, Escargot de jardin brun, Escargot de jardin brun européen

Synonymes : *Hélix Aspersa* (Muller, 1774) ; *Cantarues aspersea* (Muller, 1774);*Cantarée asperses* ou *Cryptomphalus asperses* ; *Cantareus aspersus* (Bonnet et al, 2021).

2) Zoologie :

Hélix aspersa aspersa est une sous-espèce circumméditerranéenne ubiquiste dont le polymorphisme se traduit par une variation de la taille, de la coloration, de la forme, de l'épaisseur et de la sculpture de la coquille. La coloration et le système de bandes de la coquille sont d'origine génétique mais le biotope a peut-être une action secondaire sur leur variation. Ce polymorphisme a donné apparemment, en grande partie, à la race sa potentialité d'adaptation et d'acclimations (Abarrategui et al, 2006).

I.2 Bio-écologie des gastéropodes

I.2.1 Description de la classe des gastéropodes

La classe des gastéropodes a été établie par le biologiste paléontologue français George Cuvier en 1797, ils sont des mollusques. Leur corps est mou dont la tête est bien distinct portant des tentacules sensoriels ; la masse viscérale est enroulée en hélice, le pied aplati sert à la reptation, le manteau entoure la masse viscérale et forme une cavité qui contient des branchies plumeuses parfois absentes et la paroi de la cavité du manteau sert alors de poumon. Ils sont caractérisés typiquement par leur coquille spirale susceptible d'être obturée par un opercule corné ou calcifiée, inséré sur le pied de l'animal. Toutefois cette coquille peut perdre cet aspect spiral ou même être totalement absente (**Bonnet et al, 2021**).



Figure 01 : l'escargot *Hélix aspersa muller*.

On reconnaît 4 sous-classes principales :

- Les Prosobranches,
- Les Opisthobranches,
- Les Pulmonés.
- Les Gymnomorphes.

A l'origine, tous les gastéropodes étaient aquatiques, et possédaient une coquille ainsi que des branchies. Au cours de l'évolution, une partie des gastéropodes ont perdu certaines de ces caractéristiques. Limaces et escargots au sens large font partie des gastéropodes terrestres : ils sont pulmonés et mènent une vie exclusivement terrestre (**Trapella et al2018**).

I.2.2 Classification des escargots :

L'escargot appartient à l'embranchement des mollusques, animaux à corps mou et dépourvu de squelette. Sa masse viscérale présente une torsion de 180° par rapport au pied, ce qui engendre une asymétrie plus ou moins prononcée de certains de ses organes. Cette particularité anatomique le place dans la classe des gastéropodes (**Trapella et al, 2018**).

- Embranchement des mollusques
- Classe des gastéropodes
- Sous-classe des pulmonés
- Ordre des stylommatophores (Trapella et al, 2018).

L'escargot possède un poumon (ou cavité palléale) ce qui le situe dans la sous-classe des pulmonés. Il appartient au sous-ordre des stylommatophores caractérisés par le port des yeux à l'extrémité des tentacules oculaires.

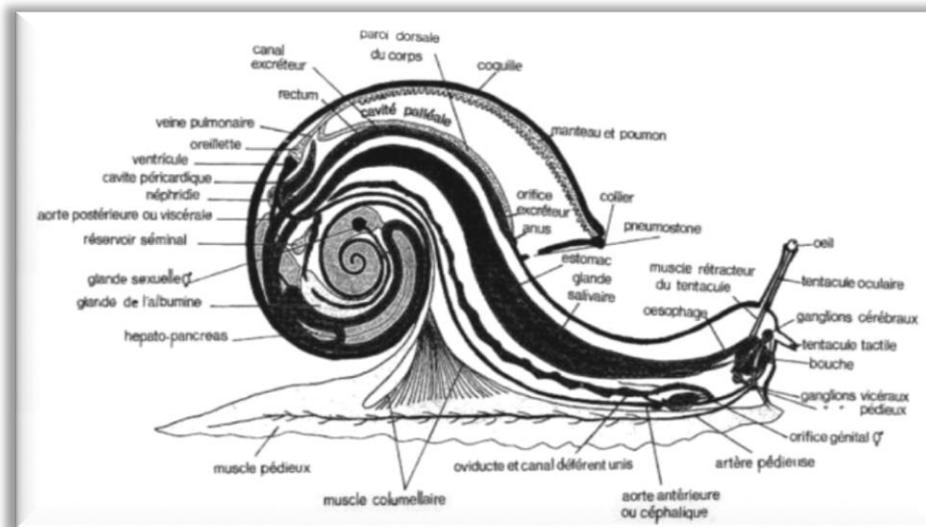


Figure 02 : Anatomie interne de l'escargot (James et al, 2003).

La forme de sa coquille enroulée caractérise la super famille des *Helicacea*. Cette super famille comprennent deux familles :

- La famille des *Helicidae* à laquelle appartiennent les escargots du genre *Helix aspersa* (Petit-gris), *pomatia* (Bourgogne), *lucorum* (Turc).
- La famille des *Achatinidae* dont l'espèce la plus connue est *Achatina fulica*. Ce sont des animaux de grande taille à coquille allongée et conique que l'on rencontre sur les continents asiatique et africain ainsi qu'en Océanie (Bonnet et al, 2021).

I.2.2.1 *Helix Aspersa* Müller (Petit-gris) –Distribution géographique :

L'escargot « Petit-gris », *Helix aspersa*, semble plutôt adapté à un climat de type océanique ou de type méditerranéen. On le trouve sur une grande partie du territoire français mais sa présence est plus importante dans les régions littorales. On le rencontre également en Grande-Bretagne, en Espagne et dans tout le bassin méditerranéen. Sa taille est plus petite que les précédents, son diamètre varie de 30 à 40 mm pour un poids vif adulte se situant entre 6 et 15 g.

La coquille est moins globuleuse et de couleur brune avec des dessins foncés dont la forme varie avec l'origine. Le pied à une couleur grise tirant sur le vert. En hibernation, l'escargot « Petit-gris » sécrète un ou plusieurs voiles muqueux venant obturer l'ouverture de la coquille et que l'on nomme épiphragme. C'est une membrane constituée d'une matrice mucoprotéique sécrétée par le bord du manteau, renforcée de carbonate de calcium, plus particulièrement au niveau d'une tache blanche de quelques millimètres de diamètre. Cette zone appelée « Kalkfleck », de par sa structure, permet des échanges gazeux avec le milieu extérieur (Bonnet et al, 2021).



Figure 03 : distribution d'*Hélix aspersa* (Madec et al. 2014).

I.2.2.2 Description morphologique d'*Hélix Aspersa muller* :

L'escargot Petit-gris *Hélix aspersa aspersa* est un mollusque sourd et quasiment aveugle mais ses tentacules sont équipés de deux épithéliums olfactifs très puissants. Simplement en balançant ses tentacules pour détecter les odeurs que l'entourent, l'escargot peut repérer une cible à plus d'une centaine de mètres. Il est adulte à deux ans mais peut vivre plus de cinq ans. 99% de l'activité de l'escargot, y compris ses « repas », a lieu de nuit avec un pic de 2 à 3 heures après la tombée de la nuit. La fraîcheur nocturne et la rosée facilitent ses déplacements (Madec et al. 2014).

Cet auteur indique que le Petit-gris mesure entre 2,8 et 3,5 cm pour un poids adulte compris entre 7 et 15 g. Il porte une coquille calcaire à motifs variables mais le plus souvent brune rayée de noir. Sa spirale tourne généralement dans le sens des aiguilles d'une montre. La coquille d'*Hélix aspersa aspersa* est gris jaunâtre souvent ornée de 1 à 5 bandes interrompues, brun violacé.



Figure 04 : morphologie de l'escargot *Helix aspersa muller*.

La bordure située à l'ouverture de la coquille est appelée péristome. La forme, l'épaisseur et la couleur du péristome ont une grande importance dans l'identification des espèces des gastéropodes. La coquille est toujours hélicoïdale. La plupart du temps, l'hélice s'enroule vers la droite, et on parle alors d'escargot à coquille dextre. Il existe également, mais de manière plus rare et anormale, des escargots à coquille sénestre, c'est-à-dire dont la coquille tourne vers la gauche, « à l'envers » (James et al, 2003).



Figure 05 : Forme sénestre (à gauche) et dextre (à droite) du Petit-gris.

Les Petit-gris adultes ont un péristome (blanc, gris ou noir) réfléchi composant la partie inférieure de la coquille, on dit alors qu'ils sont « bordés ». Chez les Gris-gris (*Helix aspersa maxima*) d'élevage, le péristome est le plus souvent noir. On rencontre 1 sénestre sur environ 20000 escargots. Le terme péristome, vient directement de la langue grecque et veut dire « autour de la bouche », est employé pour décrire diverses structures entourant l'ouverture d'un organe chez certains invertébrés comme les mollusques (Bonnet et al, 2021).

Chapitre I : Généralité sur l'escargot *Helix aspersa* (Muller).

Chez les escargots et les autres gastéropodes pourvus d'une coquille spiralée, il s'agit du rebord de l'ouverture de la coquille entourant le manteau. Le péristome est composé des dernières spires d'accroissement de la coquille. Un escargot est dit « bordé » lorsqu'il a le péristome réfléchi. Ses dernières spires sont alors concentrées et forment une bordure coquillière épaisse et légèrement relevée à la perpendiculaire des spires d'accroissement de coquille dite « juvénile ». La forme, l'épaisseur et la couleur du péristome ont souvent une grande importance dans l'identification des espèces de gastéropodes. Le bourrelet palléal (avec lequel on confond parfois le péristome) est ce qui reste visible à l'intérieur du péristome quand l'escargot est rentré dans sa coquille.

L'importance du manteau est considérable, son rôle est double : en premier lieu il intervient dans la fabrication de la coquille ; en effet sa face externe est recouverte d'un tissu sécrétant différentes couches d'une substance organique : la conchyoline 1 ou perlucine, abondamment imprégnée de sels calcaires. En second lieu, la surface interne du manteau délimite, avec la surface contiguë du corps, une cavité : la cavité palléale (du latin *pallium*, manteau) que l'on dénomme aussi parfois : cavité respiratoire (**Strzelecka et al, 2021**).

La coquille est conoïde globuleuse, ventrue, très convexe en dessus, bien obliquement bombée en dessous, sans ombilic. Son coloris est fauve brun, jaunâtre ou grisâtre orné de zigzags plus clairs que le fond, sans bandes ou avec 1 à 4 bandes sombres. Spire un peu haute, de 4 à 5 tours très convexes à croissance rapide ; test 2 solide, un peu mince.

La coquille se compose à 99 % de matière minérale. Elle grossit avec l'escargot durant toute sa croissance. Lorsqu'il est devenu adulte le bord de la coquille durcit et l'escargot est alors « bordé ». Il est à signaler que la coquille représente le tiers du poids d'un escargot adulte.

Une torsion de 180° (en sens inverse des aiguilles d'une montre) a ramené la cavité palléale en avant (juste en arrière de la tête). Conséquence de cette torsion : ploiement en « U » du tube digestif, anus rapproché de la bouche, poumons en avant du cœur, organes de droite passés à gauche et inversement, système nerveux croisé en « 8 ». La symétrie bilatérale est inversée, mais non détruite. Conséquence de cet enroulement : atrophie, puis disparition de l'oreillette et du rein du côté droit. L'animal devient asymétrique (**Huang et al, 2021**).

La coquille 3 est sécrétée par un épais pli de peau, appelé le manteau 4. Elle est composée principalement de carbonate de calcium (CaCO₃). Les gastéropodes ont donc besoin d'une alimentation riche en calcium (Ca). À la naissance, *Helix aspersa aspersa* a une coquille qui constituera l'apex de la coquille adulte. (Apex est à l'origine un mot latin signifiant « sommet » ou « pointe ». L'adjectif correspondant est apical : qui se trouve près du sommet, ou de l'extrémité. Le

pluriel est apices. Apex, le point de départ, et donc le sommet, de la coquille des mollusques en malacologie et en conchyliologie (**Huang et al, 2021**).

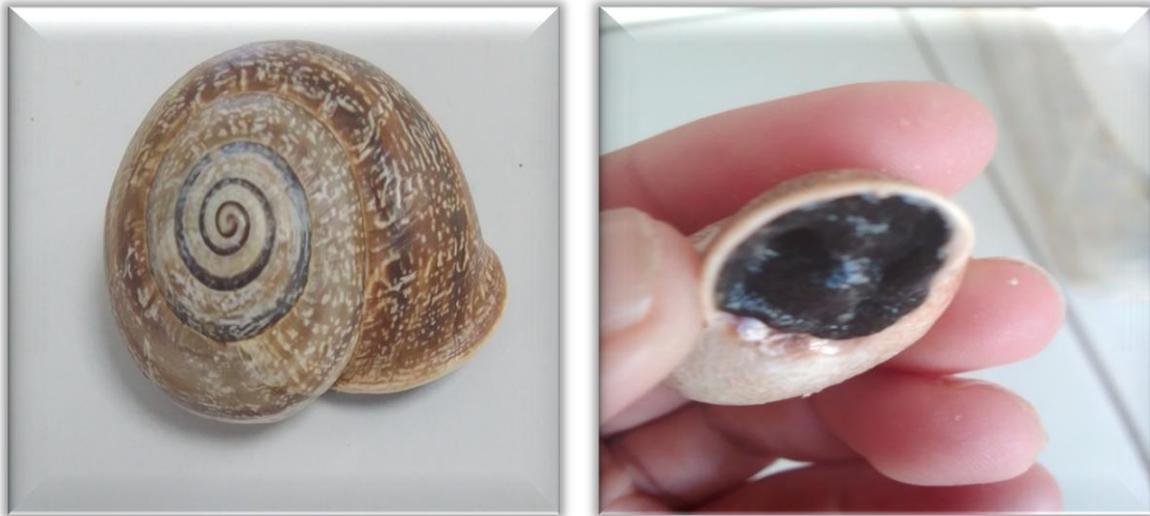


Figure 06 : la coquille de l'escargot *Helix aspersa muller*.

À partir de ce point, la croissance n'est ni continue, ni régulière. Elle peut ralentir voire s'interrompre lors des périodes d'inactivité et de jeûne de l'animal, notamment en hiver ou en cas de sécheresse prolongée : estivation. Ces irrégularités se manifestent par la formation de stries de croissance souvent visibles en surface. Le muscle columellaire maintient le gastéropode dans la coquille.

Helix aspersa aspersa dispose de deux paires de tentacules rétractiles, appelés «cornes» ou «antennes» dans le langage familier. Dans la partie supérieure de la tête la première paire de «cornes» abrite les yeux mais la vue est un sens peu utilisé. Ils possèdent surtout un bulbe olfactif sous l'œil et la deuxième paire de tentacules est un organe olfactif et tactile (épithélium) qui est en revanche très utilisé (**Bonnet et al, 2021**).

Le Petit-gris, comme de nombreux autres mollusques, dispose de neurones géants permettant l'implantation d'électrodes intracellulaires largement utilisées en recherches neurologiques pour mieux comprendre le mode de fonctionnement des neurones humains.

Principales caractéristiques de l'escargot Petit-gris : coquille conoïde globuleuse, ventrue, très convexe en dessus, bien obliquement bombée en dessous, sans ombilic ; spire un peu haute, de 4 à 5 tours très convexes à croissance rapide ; test solide, un peu mince, fauve brun, jaunâtre ou grisâtre orné de zigzags plus clairs que le fond, sans bandes ou avec 1 à 4 bandes sombres. Longueur : 20 à 40 mm ; Diamètre : 25 à 45 mm. Longévité : 5 ans (**Bonnet et al, 2021**).

I.2.3 Déplacement :

Helix aspersa se déplace, seulement vers l'avant, grâce à son pied, qui est en fait un gigantesque muscle qui se contracte et s'allonge alternativement. Sa vitesse moyenne pour un adulte est d'un 1 mm/s soit 3,6 m/h. L'escargot arrive à déplacer 170 fois son poids, autrement dit un escargot qui pèse 10 g par exemple peut déplacer un poids d'environ 1,5 kg (Viani et al, 2017)

Ses glandes sécrètent différents types de mucus (la « bave ») contenant de nombreux composés (allantoïne, collagène, élastine) qui lui permettent à la fois d'avancer plus facilement en glissant sur les obstacles et de se fixer même verticalement sur certaines parois. Le mucus sert aussi à se débarrasser de certaines substances, comme les métaux lourds, et entre aussi dans la composition de la coquille (Viani et al, 2017).

Le mucus est épais, il durcit et sèche au contact de l'air en laissant une traînée brillante à la lumière. Les mucus sont différentes sécrétions visqueuses et translucides, produites par divers organismes, et chez ceux-ci par diverses organes ou muqueuses. Les escargots produisent des mucus externes ayant des fonctions de protection et parfois de facilité de déplacement, voire de communication (Bonnet et al, 2021).



Figure 07 : Ondes de contraction sur la face ventrale des pieds d'escargots (Pol, 2001).

L'allantoïne est un composé chimique azoté, de formule $C_4H_6N_4O_3$, découvert par le pharmacien et chimiste français Vauquelin dans le liquide amniotique de la vache ; il a été trouvé également dans l'urine du veau. L'industrie cosmétique utilise l'allantoïne extraite du mucus de certains gastéropodes, dont les escargots (Aleruchi et al, 2016).

Chapitre I : Généralité sur l'escargot *Helix aspersa* (Muller).

L'allantoïne est le produit de l'oxydation de l'acide urique. Accélérateur de la cicatrisation de la peau et la régénération des cellules. Elle est utilisée en cas de plaie ou brûlure aussi bien en médecine qu'en cosmétique (allantoïne extraite de la bave d'escargot). On en trouve dans les dentifrices, shampooing, rouge à lèvres, produit anti-acné, crème solaire, etc. L'allantoïne n'est pas antiseptique. En raison de possibles interactions, les préparations contenant de l'allantoïne ne doivent pas être stockées dans des récipients de métal (Madec et al. 2014).

Le collagène est une glycoprotéine fibreuse dont le rôle peut être comparé à une armature. Il s'agit de la protéine la plus abondante de l'organisme et représente le quart de toutes les protéines de l'organisme. Il est sécrété par les cellules des tissus conjonctifs.

Contrairement à l'élastine, le collagène est inextensible et résiste bien à la traction. Il est constitué de différents types selon leur localisation. Il est notamment indispensable aux processus de cicatrisation. Après certaines transformations, on peut en faire de la colle.

L'élastine est une protéine fibreuse de type structural. Sécrétée par les fibroblastes essentiellement durant la période de croissance, elle possède des propriétés élastiques. Sa synthèse diminue avec l'âge et l'élastine se trouve remplacée par du collagène inextensible. Les vergetures sont un exemple visible de ce processus, qui est lié à des contraintes mécaniques. Le vieillissement cutané en est un deuxième exemple (Madec et al. 2014).

I.2.4 Alimentation :

Helix aspersa aspersa, à l'image de tous les escargots, s'alimente grâce à une langue dentée nommée radula formée de 1 500 à 2 500 dents. Sa langue est couverte d'aspérités très dures, disposées en rangées régulières, comme la râpe du menuisier. La bouche a une langue appelée radula. Au-dessus de la bouche, il y a une arête dure et la nourriture est écrasée entre la radula et cette arête (Bonnet et al, 2021).

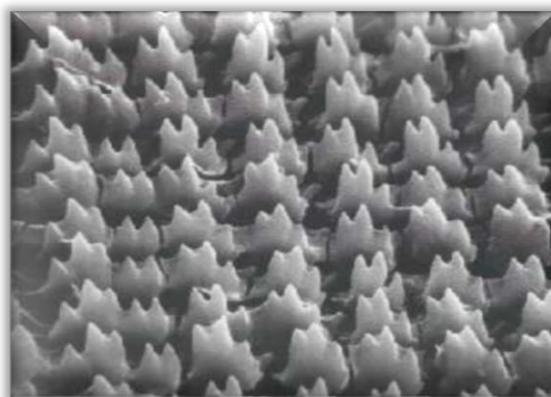


Figure 08 : Partie de la langue râpeuse de l'escargot, la radula, grossie 4000 fois à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Pol, 2001).

Chapitre I : Généralité sur l'escargot *Helix aspersa* (Muller).

La radula (du latin *rādula*, “grattoir”) est la langue munie de nombreuses dents chitineuses, formant une râpe, que l'on trouve dans la cavité buccale des mollusques. La disposition des dents est suffisamment spécifique pour servir à l'identification de l'espèce (**Bonnet et al, 2019**)

Les dents qui s'usent à l'avant sont remplacées par de nouvelles dents à l'arrière de la radula (fonctionnement en tapis roulant). Au-delà de l'intérêt taxonomique, l'observation radulaire permet de reconnaître le type de nutrition du gastéropode. La radula fonctionne en faisant des mouvements de va-et-vient grâce aux muscles qui s'attachent à l'odontophore, sorte de plaque rigide qui supporte la radula.

Helix aspersa aspersa est phytophage (phyllophage et succivore), carpophage (ou frugivore), détritivore et parfois cannibale. Il peut s'attaquer aux plantes cultivées des jardins, causant parfois de gros dégâts aux récoltes. Il héberge dans son intestin une flore bactérienne qui participe à la digestion des végétaux. Les bactéries se maintiennent en vie durant l'estivation ou l'hibernation, en se nourrissant du mucus qui est sécrété par l'épithélium intestinal (**Pol, 2021**).

Selon Iglesias et Castillejo, 1998, le Petit-gris s'alimente la nuit, se nourrit tout particulièrement de feuilles de la Grande Ortie (*Urticadioica L. 1753 –Urticaceae.*), appelée encore Ortie dioïque ou Ortie commune « *Houraïga* ». Parmi leurs plantes préférées on recense le Lierre grimpant : *Hedera hélix L. Araliaceae* « Qessous, Fettana, Mahboula » (**Bonnet et al, 2019**).



Figure 09 : l'alimentation de l'escargot *Helix aspersa* muller.

I.2.5 Longévité :

Helix aspersa aspersa est adulte à deux ans mais peut vivre plus de cinq ans. Dans la nature, il dépasse rarement l'âge de trois ans. Sa mort est souvent due à des prédateurs ou à des parasites. En captivité, sa longévité est bien plus longue et va de 10 à 15 ans. Certains individus ont vécu plus de trente ans.

I.3 Le mucus de l'escargot *Hélix aspersa muller* :

Le pied des gastéropodes est recouvert d'une fine couche de ce mucus, qui est utilisé pour une variété de fonctions, y compris l'adhésion, la lubrification, la répulsion d'éventuels prédateurs et pour s'accoupler pendant la reproduction. Cette décharge pédique a une apparence de gel, contenant environ 91 à 98% en poids de l'eau, selon les espèces, combiné à une petite quantité de glycoprotéines de haut poids moléculaire.

Il existe deux types de mucus chez *H. aspersa* : le mucus dit " traîné " (produit par les glandes de la région ventrale, la plante du pied, responsables de la locomotion de l'animal) ne contient qu'une faible quantité de protéines, tandis que dans le mucus " adhésif " (produit par les glandes de la partie dorsale et l'épithélium du pied latéral, est utilisé pour la fixation de l'animal au substrat formant l'épiphragme), trois bandes de protéines (82, 97 et 175 · kDa) ont été détectées (Schileyko et al, 2000).

Il a également été décrit que la nature de la stimulation de l'escargot détermine clairement le type de sécrétion qu'il libère, qui varie d'une sécrétion visqueuse et collante produite dans des conditions normales ou par stimulation lumineuse, jusqu'à une sécrétion mousseuse et claire que l'escargot libère sous une stimulation continue et même violente.

Pour *Hélix aspersa*, il est postulé que l'une des causes que les cellules glandulaires libèrent cette sécrétion, c'est que des changements de pression constants se produisent dans le système circulatoire de l'escargot, qui se produisent en raison du propre mouvement de l'escargot, qui comprime les corps cellulaires glandulaires qui répondent en libérant la sécrétion (Thomas Boulanger 2017).

I.3.1 Les glandes sécrétrices du mucus :

Selon une étude comparative réalisée par Greistorfer et alen (2017) sur les glandes sécrétrices du mucus chez *Hélix pomatia* et celles d'*Hélix aspersa* réalisée par Compion en 1961, ils signalent les points suivants : L'épithélium du pied de *H. pomatia* et *H. aspersa* est semblable, il contient une seule couche de cellules cylindriques ; cependant, son épaisseur diffère d'une espèce à l'autre (chez *H.aspersa* : 25–33 µm ventralement ; chez *H. pomatia* : 50 µm ventralement).

Les deux espèces diffèrent également en ce qui concerne le nombre de glandes dans les couches glandulaires dorsale et ventrale. Cinq types de glandes différents pourraient être clairement séparés morphologiquement dans le pied dorsal et ventral de *H. pomatia* par contre Campion (1961) a différencié huit types de cellules au total dans l'épithélium du pied d'*Hélix aspersa* (Thomas Boulanger 2017).

a. Dans la région dorsale :

La comparaison des résultats des deux espèces *Helix*, montre que le type de glande dorsale H1d chez *H. pomatia* correspond morphologiquement et histochimiquement au type de glande A chez *H. aspersa*.

De même, le type de glande H2d chez *H. pomatia* est assez similaire au type de glande B chez *H. aspersa*. Néanmoins, les deux types de glandes de *H. aspersa* sont plus gros que ceux décrits dans *H. pomatia*. Chez *H. aspersa*, des différences de taille de glande ont été notées entre le manteau et la zone du pied dorsal. Aucun type de glande chez *H. aspersa* ne correspond à H3d confirmant la présence d'un type de glande supplémentaire chez *H. pomatia*. Au lieu d'un type de cellule calcique spécifique, le calcium a été observé chez *H. pomatia* distribué de manière diffuse dans le tissu environnant autour de H1d (Thomas Boulanger, 2017).

b. Dans la région ventrale(plante du pied) :

En comparant les deux espèces *Helix*, la gland ventrale H1v est similaire au type C en taille et en contenu chimique. De plus, il ne peut être exclu que le type de glande H2v décrit chez *H. Pomatia* corresponde au type de glande immature D chez *H. aspersa*. Une caractérisation ultra structurale des glandes d'*H. aspersa* peut être nécessaire pour vérifier ces hypothèses. Là encore, des cellules spécifiques contenant du calcium manquent au niveau du ventre chez *H. pomatia*.

c. Dans la zone transitoire :

Entre les régions dorsale et ventrale, une sécrétion (glande de type B) et trois cellules non productrices de mucus (pigment, calcium et lipide) ont été décrites chez *H. aspersa*. Chez *H. pomatia*, seule la glande dorsale de type H2d(glande de type B chez *H. aspersa*) est présente ventralement et la glande de type H1v(glande de type C chez *H. aspersa*) apparaît marginalement dans la région dorsale (Lauth et al, 2002).

I.3.2 Composition de mucus ou la bave d'escargot :

La composition de la sécrétion d'escargots, à la fois *Helix aspersa Müller*, ainsi que d'autres espèces, varie en raison des facteurs suivant : Selon la manière dont elle est extraite, les conditions environnementales où elle se trouve, la saisonnalité et les habitudes alimentaires auxquelles elles sont soumises, les types de polluants et par conséquent ont une influence sur les propriétés d'un produit à fabriquer avec cette bave, comme les crèmes à usage cosmétique. Ces gels, comme la plupart des sécrétions muqueuses, sont constitués d'un réseau dilué de polymères, contenant généralement plus de 95% d'eau.

Selon **Maire et Del pozo 2008** ; la bave d'escargot se caractérise par un aspect liquide transparent avec une couleur dorée et une légère odeur caractéristique et un pH entre 6,5- 7,6.Elle comprend les actifs suivants d'intérêt cosmétique :

- **L'allantoïne** : est utilisée pour maintenir le bon état de la peau, la cicatrisation des petites plaies et la stimulation de la régénération cellulaire.
- **Antibiotiques naturels** : Ils sont capables d'agir contre les bactéries normalement présentes sur la peau, notamment *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *P. acnes*, en la protégeant des infections.
- **Protéines et vitamines** : L'escargot les obtient grâce à sa nourriture végétale. Les protéines(haut et bas poids moléculaire) contribuent au bon état trophique de la peau, tandis que les vitamines ont également des propriétés anti-inflammatoires qui renforcent l'action des antibiotiques naturels contenus dans le même substrat.
- **Acide hyaluronique** : Il a une action hydratante et régénérant, lubrifie et donne un toucher doux à la peau.
- **Acide glycolique** : Cet alpha hydroxy acide est présent dans la bave d'escargot à une concentration capable de produire une élimination en douceur des couches les plus superficielles de cellules mortes et de favoriser leur remplacement par de nouvelles, formées sous la stimulation de l'allantoïne. L'élimination des couches superficielles de la peau contribue à améliorer la pénétration d'autres substances appliquées à sa surface, telles que l'élastine et le collagène, à travers les follicules pileux, augmentant l'action de l'ingrédient actif.
- **Antiprotéases** : Ce sont des enzymes qui contrôlent les protéases de la peau, des protéines dédiées à la dégradation du collagène et de l'élastine. L'activation exacerbée des protéases cutanées implique la destruction du support fibreux qui forme le derme, avec formation d'affaissement et diminution de l'épaisseur de la peau. Par conséquent, les anti protéases présentes dans la bave d'escargot aident à ralentir le vieillissement cutané.

-Selon **Vanden Haute et al. (2019)**, dans une étape préliminaire l'analyse des composants de la bave a été réalisée, faisant ressortir une forte concentration en acide glycolique et en collagène, de même que la présence de diverses vitamines et en particulier celles à fort pouvoir anti oxydant (vit D, E) (**Thomas Boulanger 2017**).

I.3.3 Les bienfaits de la bave d'escargot

a. L'action hydratante et nourrissante de la bave d'escargot :

Environ 80% de la peau est composée d'élastine et de collagène. Ces protéines sont naturellement présentes dans la bave d'escargot et déterminent les propriétés de souplesse et d'élasticité de la

peau. Elles permettent la régénération tissulaire et notamment de lisser durablement les rides ainsi que les vergetures dans la phase de vieillissement de la peau. En d'autres mots, elles aident à faire peau neuve.

b. L'action régénérant de la bave d'escargot :

L'hémocyanine une protéine dans la bave d'escargot et les protéases à sérine, agissent sur le processus du vieillissement en activant la respiration et le renouvellement cellulaire de la peau, l'ARN hélicase. C'est une enzyme spécialisée dans des processus cellulaires cruciaux tel que la réparation de l'ADN, et la protéine RIF1 associée aux télomères sert à la stabilité des cellules et intervient dans le processus du vieillissement cellulaire et la protection de l'ADN endommagé.

c. L'action cicatrisante de la bave d'escargot :

L'allantoïne et l'actine interviennent dans le processus de cicatrisation des plaies et favorisent la réparation des tissus. De plus, la myosine et la protéine PDI en s'associant à l'actine aident également à charger les peptides responsables de la réponse immunitaire. Toutes ces protéines présentes dans le mucus permettent d'aider à cicatriser en profondeur le derme et réparer les tissus(Lauth et al, 2002).

d. L'action purifiante de la bave d'escargot :

Les Peptides Antimicrobiennes, l'Actine, et les Cytokératines servent de point d'appui au système immunitaire et aident à limiter la prolifération des bactéries sur la peau. Nous avons également démontré un effet bactériostatique sur *S. epidermidis* qui est lié à certaines infections cutanées de la peau tel que l'acné. Plus de 80% des adolescents en sont atteints (acné juvénile) et il est de plus en plus fréquent de voir l'acné persister chez l'adulte, et plus particulièrement chez les femmes (acné hormonal)(Lauth et al, 2002).

e. L'action antioxydant :

Les composés oxygénés comme la Vitamine D (Vitamine D3, D4, Ergostérols) et les protéases à sérine jouent un rôle prépondérant dans le renouvellement de la peau en neutralisant l'action des radicaux libres. (Fragment obtenu par scission d'une molécule et qui possède un électron célibataire, non apparié, ce qui lui confère une grande réactivité chimique. C'est donc une molécule instable, très réactive avec les molécules environnantes).

f. L'action exfoliante de la bave d'escargot :

L'acide glycolique redonne de l'éclat au teint en éliminant les peaux mortes et permet de réduire les taches cutanées et les cytokératines de type II sont des kératines présentes dans les tissus épithéliaux. Ils ont la particularité d'être basiques ou neutres ($\text{pH} \geq 7$). Ils s'associent avec les

cytockératines de type I pour former des filaments intermédiaires. Ils jouent un rôle dans l'établissement de la barrière épidermique sur la peau.

Des recherches réalisées par **Di Filippo et al.(2020)** montrent que Les films d'emballage alimentaire ont été développés en utilisant de la bave d'escargot *Helix aspersa* et des dérivés de cellulose. Cette bave améliore fortement les propriétés mécaniques et barrières de ces films qui présentent une bonne activité antibactérienne et une barrière lumineuse UV-visible élevée. Ainsi l'ajout de bave d'escargot *Helix aspersa* réduit la solubilité des films à base de CMC.

Un travail réalisé par **Ellijimi et al.(2018)** montre pour la première fois que la bave d'escargot *Helix aspersa maxima* inhibait la teneur en mélanine et diminuait l'activité de la tyrosinase dans les cellules de mélanome le type le plus dangereux de cancer de la peau. Fait intéressant, contrairement à de nombreux produits de blanchiment qui ont été impliqués dans l'induction du cancer, Il a été constaté que les *Helix aspersa* inhibaient la croissance de deux lignées cellulaires de mélanome humain et n'affectaient pas les cellules Kératinocytaires humaines immortalisées prises comme cellules non tumorigènes.

Pitt et al.(2015) ont constaté dans leur travail que le mucus des escargots bruns *Helix aspersa* tue une espèce particulière de bactéries dans des expériences de laboratoire. Il s'agit d'un organisme appelé *Pseudomonas aeruginosa*, qui peut provoquer des infections sanguines, une pneumonie, des infections chroniques des plaies et des infections respiratoires chez les personnes atteintes de fibrose kystique.

Selon **Kerkutet Laveracken (1960)**, les extraits tissulaires de l'escargot *Helix aspersa* tels que le cerveau, le manteau, le pied, l'intestin moyen et le cœur, ont une propriété d'accélération cardiaque (**Thomas Boulanger, 2017**).

Chapitre II : Généralités sur la Toxinogénèse, L'activité Anti-inflammatoire et Antioxydante

Chapitre II : Généralités sur la Toxinogénèse, L'activité Anti-inflammatoire et Antioxydante

II.1. Description de certains microorganismes pathogènes

Les bactéries pathogènes pour l'homme sont à l'origine de multiples maladies infectieuses, qui en particulier dans les pays en voie de développement, font encore des ravages.

En 1995, les maladies infectieuses ont été responsables d'un tiers (17 millions de personnes) des décès dans le monde.

Une bactérie est un parasite, si elle ne vit que dépend d'un autre organisme, saprophyte dans le cas inverse : l'appellation pathogène caractérise un agent infectieux qui induit une maladie infectieuse, le passage de l'état de saprophyte à celui de parasite est en fonction de la façon dont la bactérie acquiert une virulence nouvelle et de la défaillance des défenses de l'hôte (Immunodépression par exemple). A l'état normal, l'homme héberge sur sa peau, ses muqueuses, dans ses voies aériennes et son tube digestif un grand nombre de bactéries saprophytes qui ne provoquent pas d'infection.

Le pouvoir pathogène d'une bactérie est dû à son aptitude propre à envahir les tissus en résistant aux défenses de l'hôte et en se multipliant (virulence). Il peut également être dû à l'aptitude du germe à sécréter une toxine, c'est une macromolécule douée d'une action toxique chez l'homme (ex : toxine diphtérique et tétanique), on parle alors de toxicité (Bonnet et al., 2021).

II.1.1. Physiologie

a. Les *Bacillus cereus* pathogènes

Bacillus cereus est une bactérie sporulante pathogène, cause majeure de toxi-infections alimentaires en Europe. Certaines souches de *B. cereus* peuvent croître à basses températures et donc se multiplier durant la conservation d'aliments réfrigérés. L'adaptation au froid d'une bactérie se traduit par une phase de latence durant laquelle la bactérie ne se multiplie pas et modifie sa physiologie pour répondre aux contraintes imposées par les basses températures. La durée de la latence est particulièrement variable et les mécanismes déterminant cette phase sont mal connus. D'un point de vue pratique, il en résulte une difficulté à prévoir le risque de multiplication de *B. cereus* dans les aliments réfrigérés (Christophe et al., 2019).

Le terme *Bacillus* signifie une forme de bâtonnet, et *cereus* peut être traduit du latin par colonie d'aspect cireux. Le nom reflète donc la forme microscopique facilement reconnaissable du groupe *B. cereus*. Les membres de ce groupe appartiennent à la famille des *Bacillaceae*. Le groupe *B.*

Chapitre II : généralité sur toxinogénèse

Cereus est décrit également par sa capacité à former des spores résistantes en conditions dites défavorables ou extrêmes. Ce groupe comprend au moins 8 espèces étroitement apparentées dont les plus décrites sont : *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* (Bcss), *B. thuringiensis* (Bt), *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* et plus récemment *B. toyonensis* a été validée comme une nouvelle souche.

Le cycle de vie de la plupart des espèces du groupe *B. cereus* est caractérisé par deux phases : d'une part la division des cellules bactériennes et d'autre part la formation de la spore.

Les formes végétatives du groupe *B. cereus* se présentent sous forme de bacilles, Gram positif de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes. La plupart sont anaérobies facultatives et flagellées. Ces bacilles sont capables de se développer sur des milieux gélosés nutritifs conventionnels, en formant des grandes colonies blanchâtres, granuleuses et aux contours irréguliers (Kramer et al., 1989).

Leur croissance est observée à des températures se situant entre 7°C et 50°C selon l'espèce concernée, leur température optimale de croissance étant d'environ 37 °C. Ces bactéries ont une structure constituée d'une membrane interne et d'un peptidoglycane épais afin de maintenir la forme et l'intégrité de la cellule, en l'absence de membrane externe. Ces cellules végétatives sont décrites pour avoir une incapacité à métaboliser le mannitol mais elles sont capables de synthétiser la lécithinase. Ces caractéristiques biochimiques permettent leur discrimination sur un milieu sélectif appelé milieu Mossel (Boulanger et al., 2017).

b. Pouvoir pathogène :

Le groupe *B. cereus* est connu pour être opportuniste pour l'Homme causant plusieurs types de maladies. Cette espèce à deux types de syndromes gastro-intestinaux dits diarrhéique ou émétique. La pathogénicité de *B. cereus* est basée sur une panoplie de facteurs de virulence pouvant donner lieu à des symptômes diarrhéiques, et/ou émétiques (Boulanger et al., 2017).

1) Le syndrome diarrhéique :

C'est la forme la plus diagnostiquée suite aux intoxications alimentaires provoquées par le groupe *B. cereus*. Ce syndrome est causé par l'ingestion de *B. cereus* sous la forme de spores ou de cellules végétatives. Au cours de son cycle de vie, l'espèce *B. cereus* possèdent deux morphologies distinctes : les spores et les cellules végétatives, qui peuvent toutes 2 être ingérées avec l'alimentation. Les spores ne sont pas pathogènes et la cytotoxicité provient de facteurs de virulence exprimés par les cellules végétatives.

Chapitre II : généralité sur toxinogénèse

Le syndrome diarrhéique se caractérise par l'apparition de douleurs abdominales accompagnées de diarrhées et il peut être parfois associé à des vomissements. Ces symptômes apparaîtraient en moyenne entre 8 à 16 heures après l'ingestion d'une dose supérieure ou égale à 10^5 CFU/ gramme d'aliment(Boulanger et al., 2017).

2) Le syndrome émétique :

Le syndrome émétique résulte d'une intoxication alimentaire et apparaît généralement entre 0.5 et 5 heures après l'ingestion d'un aliment contaminé. La rapidité de l'apparition de ces symptômes est due à l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Le syndrome émétique se caractérise par l'apparition de crampes abdominales suivies des vomissements importants, et peut conduire parfois à des déficiences hépatiques graves, voire même à des décès. Hormis ces cas graves, le rétablissement est généralement spontané après 6 à 24 heures(Boulanger et al., 2017).

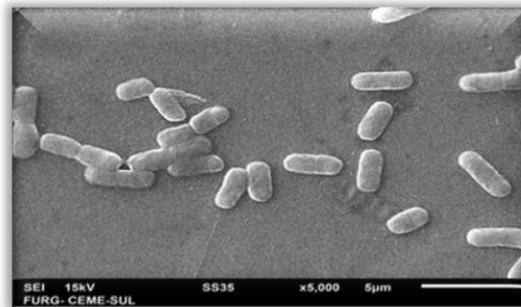


Figure 10 : *Bacillus cereus* vue microscope électronique (João et al., 2017).

c. *Bacillus subtilis* :

Les cellules de *Bacillus subtilis* sont des bactéries *Gram+* qu'on trouve dans la nature en forme de bâtonnet. *Bacillus subtilis* pousse dans une gamme de température mésophile. La température optimale est de 25-35°C. En environnement défavorable à son développement, *B.subtilis* est capable de sporuler pour survivre dans des conditions difficiles. Plusieurs secteurs industriels s'intéressent à *Bacillus subtilis*. Cette bactérie sécrète des enzymes d'intérêts industriels tels que les amylases utilisés pour la production de pain, les protéases et les cellulases employés dans les industries agroalimentaires et des détergents. L'industrie pharmaceutique exploite la capacité de *Bacillus subtilis* à produire des antibiotiques(Skehan et al.,2019).

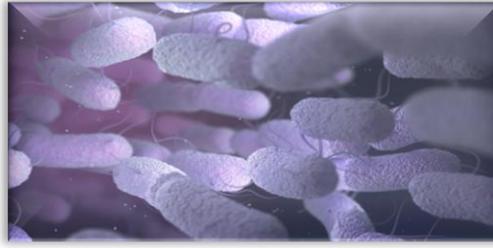


Figure 11 : *Bacillus subtilis* (Marieke et al.,2017).

d. *Staphylococcus aureus* :

-Forme : cocci

-Gram: positif

-Culture : aérobie-anaérobie facultatif

-Genre : *Staphylococcus*

-Espèce : *aureus*

-Nom courant : *staphylocoque doré*

-Morphologie : diplocoques ou amas

-Habitat : peau, muqueuses et fosses nasales et le pharynx en majorité

Staphylococcus aureus, autrement appelé *Staphylocoque* à coagulase positive, est une bactérie à gram positif. C'est un coccus, de forme arrondie, qui se présente sous la forme de diplocoques (des cocci associés par deux) ou sous la forme d'amas ayant la forme de grappes de raisin. Son réservoir naturel est l'homme.

Staphylococcus aureus est très fréquent à l'état commensal et pathogène. En effet, très rapidement après la naissance, il colonise la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveaux nés. Il est également très présent au niveau des fosses nasales et des mains.

Mais il peut devenir pathogène et être responsable d'infections cutanées : furoncles, panaris, abcès, impétigo... Et de certaines infections ORL : angines, otites, sinusites... En milieu hospitalier, il est impliqué dans les infections nosocomiales, pouvant être graves. *Staphylococcus aureus* peut aussi être responsable d'intoxications alimentaires. Il se transmet par les mains ou par voie oropharyngée, peut ainsi diffuser son mode épidémique dans les maternités, les écoles, les crèches. Pouvant survivre dans le milieu extérieur, il peut être retrouvé sur la literie, dans le matériel médical à l'hôpital, ce qui amplifie les phénomènes de transmission(Sanofi et al.,2022).

Chapitre II : généralité sur toxinogénèse

Le *staphylocoque* doré peut infecter tous les organes. Il est important de noter que 30 à 50% de la population est porteur sain du *staphylocoque*, c'est-à-dire que la bactérie est retrouvée au niveau de la peau ou des muqueuses externes, notamment nasales, sans qu'aucun symptôme ne soit développé. Ce type de portage est normal et le *staphylocoque* est considéré comme un membre de la flore bactérienne naturelle de la peau et des muqueuses (**institut Pasteur France, 2021**).

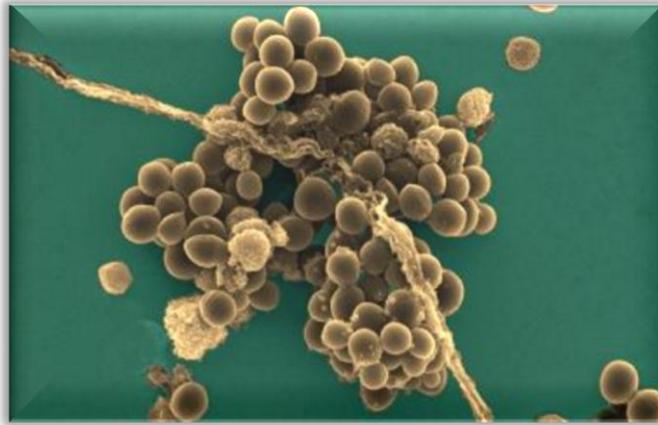


Figure 12 : *Staphylococcus aureus*(institut pasteur France,2021).

e. *Escherichia coli* :

Escherichia coli nommé aussi "*colibacille*" découverte par le pédiatre « allemand autrichien Theodor Escherich » à partir d'un échantillon de selles humaines en 1885. C'est un bacille d'environ 2-3 μm de long et 0,6 à 0,7 μm de diamètre, Gram négatif, non sporulée, souvent mobile, de la famille des Enterobacteriaceae, hôte commun du tube digestif des humains et des animaux.

Le genre d'*Escherichia* est composé de cinq espèces: *E. albetii*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulnérans*, avec *E. coli* comme espèce-type. Sur la base de ses antigènes de surface (O somatique, antigène flagellaire H et antigène capsulaire K), *E. coli* se différencie en plus de 190 sérogroupes(**Skehan et al.,2022**).

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie qui réside dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches de *E. coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes pour l'homme. C'est le cas des souches d'*E. coli* dites entérohémorragiques (ECEH). Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'ECEH sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux (viande ou produits laitiers) mal cuits ou consommés crus. Les fruits et les légumes frais, ayant été en contact avec des ECEH peuvent être également à risque(**Institut Pasteur France,2021**).

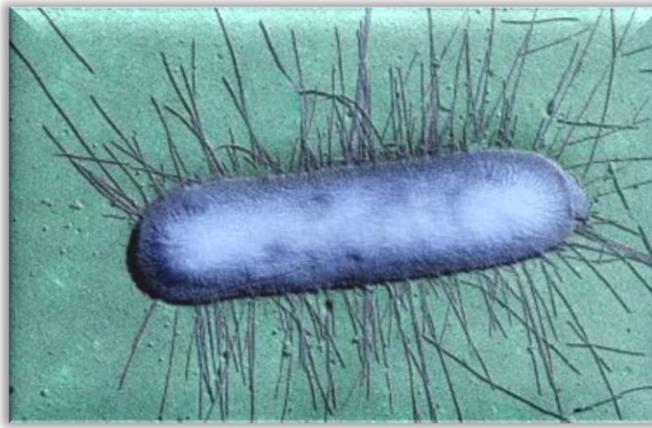


Figure 13 : *Escherichia coli*(institut pasteur France, 2021)

f. *Salmonella typhi* :

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif, généralement mobiles (possédant une ciliature péri-triche) (à l'exception de *S. Pullarum-Gallinarum*). Ces bâtonnets de 2 à 3 µm de long sont des bactéries mésophiles, peu exigeantes d'un point de vue nutritionnel. Elles peuvent se cultiver sur milieu ordinaire contenant des extraits de viande, et donnent en 18 à 20 heures, des colonies de 2 à 3 millimètres de diamètre à l'exception de certains sérovars donnant toujours des colonies naines(**Abortus et al., 2018**).

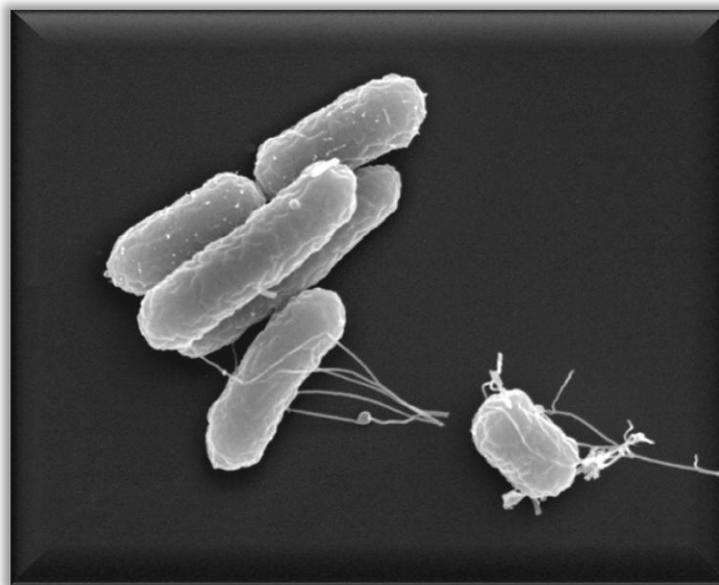


Figure 14 : *Salmonella typhi* en microscopie à balayage(Institut Pasteur, 2020).

g. *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif de la famille des Pseudomonadaceae. Elle est aussi appelée bacille pyocyanique en raison de sa forme allongée et de la production de pigments bleus et verts par la bactérie : la pyocyanine et la pyoverdine.

Chapitre II : généralité sur toxinogénèse

La bactérie a été découverte en 1882 par **Carle Gessard**, un pharmacien des armées et bactériologiste français. Une expérience sur les colorations bleues et vertes du pus laissé sur les bandages recouvrant les plaies des soldats lui a fait identifier un pigment soluble dans l'eau et fluorescent lorsqu'il est exposé à la lumière ultraviolette. Son étude l'amène isoler la bactérie à conclure sur la nature pathogène de *P. aeruginosa* et à classer la souche.

Ce micro-organisme est ubiquitaire et se retrouve sous forme de saprophyte, en particulier dans les milieux humides : la bactérie a pour habitat naturel l'eau douce, le sol et les plantes. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie stricte, c'est-à-dire qu'elle a besoin d'oxygène pour vivre et se développer.

P. aeruginosa se retrouve sous deux phénotypes distincts :

- Une forme planctonique : les bactéries sont mobiles grâce à leurs flagelles et leurs pilé.
- Une forme communautaire : les bactéries s'agrègent sous forme de biofilms.

Grace à ses nombreux facteurs de virulence et à sa capacité d'adaptation, la bactérie est capable d'infecter un large spectre d'hôtes, allant des plantes aux mammifères en passant par certains insectes(Ariane et al., 2020).



Figure 15 :Observation de *P. aeruginosa* au microscope électronique (Dennis et al.,2019)

h. Candida albicans :

Candida albicans est un champignon levuriforme du genre *Candida* et de la famille des *saccharomycetaceae*.

Le *Candida albicans* est classé parmi les champignons asexués dont la reproduction est majoritairement clonale. C'est un organisme diploïde qui possède 8 paires de chromosomes. Son hétérozygotie lui confère une grande capacité d'adaptation à divers milieux.

Le *Candida albicans* est naturellement constitutif de la flore de la muqueuse de l'être humain. Sa présence n'est pas pathologique. En effet, ce champignon se retrouve dans le tube digestif de 70% des adultes en bonne santé.

Chapitre II : généralité sur toxinogénèse

Cependant, un déséquilibre hormonal ou immunitaire peut être responsable d'une multiplication anarchique de ce champignon qui provoque alors certains symptômes. On parle alors de candidose ou encore de mycose (Dora et al.,2022).



Figure 16 : *Candida albicans* (Dora et al.,2022).

II.2.Le stress oxydatif

Le stress oxydant se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels. Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées tels que les radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes, rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés dans l'orbitale la plus externe.

L'équilibre est rétabli soit par oxydation (perte de cet électron libre) ou par réduction (gain d'un autre électron). Le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas, l'électron libre peut passer sur d'autres molécules ; c'est le phénomène d'oxydation en chaîne.

Plusieurs facteurs influencent le stress oxydatif, certains augmentant la production des ERO comme la consommation élevée d'O₂ au cours d'une activité sportive intense avec dépenses énergétiques, d'autres réduisent les capacités antioxydants tels que le déficit enzymatique congénital en G6PD.

Les ERO sont des espèces électrophiles de courte durée de vie (quelques nanosecondes), elles font partie des systèmes ubiquitaires ayant une réactivité chimique délétère à l'égard des biomolécules, cette réactivité est inversement proportionnelle au pouvoir oxydant ($\text{OH}^\circ > \text{RO}^\circ > \text{HOO}^\circ > \text{ROO}^\circ$) (Moore et al.,2018).

II.3. L'activité anti-inflammatoire

Réaction localisée d'un tissu, consécutive à une agression. Une inflammation se manifeste par quatre signes principaux :

- Rougeur.
- Chaleur.
- Œdème.
- Douleur.

Lorsqu'un tissu subit une agression, des cellules spécialisées, les mastocytes, libèrent de l'histamine et de la sérotonine, qui stimulent la vasodilatation dans la partie affectée, ce qui provoque rougeur + chaleur.

Les capillaires, surchargés, laissent échapper du liquide, qui s'infiltré dans les tissus, y entraînant un gonflement et causant une sensation douloureuse, provoquée par la stimulation des terminaisons nerveuses locales.

L'inflammation s'accompagne généralement d'une accumulation de globules blancs qui contribuent à l'assainissement et à la restauration des tissus endommagés. Elle constitue donc une réaction de défense de l'organisme contre les agressions.

Donc la réaction inflammatoire se déroule en 3 étapes principales :

- Phase vasculaire avec dilatation et perméabilité des vaisseaux.
- phase cellulaire marquée par un afflux de polynucléaires et macrophages, libération d'enzymes, de phagocytose et production de lymphokines.
- phase de régénération et de cicatrisation correspondant à la synthèse du collagène par les fibroblastes(**Boulanger et al., 2017**).

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université de Mostaganem, durant la période de Février à Juin 2023.

III.1.L'objectif de l'expérimentation

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets antibactériens, antioxydant et anti-inflammatoire de l'escargot *Helix aspersa* (Muller). L'étude comporte deux parties :

Partie 01 :Collecte du mucus de l'escargot *Helix aspersa*.

Partie 02 : évaluation des activités antibactériennes, antioxydants, et anti-inflammatoire in vitro du mucus d'*Helix aspersa*.

III.2.Matériel animal

Le matériel animal utilisé au cours de cette étude est l'escargot *Helix aspersa* (Muller) acheté du marché couvert de Mostaganem en le Algérie 05 mars 2023.



Figure 17 : l'escargot *Helix aspersa muller*.

III.3. Origines des souches testées

Les souches testées utilisées dans ce travail proviennent de la collection du laboratoire LMBAFS.

Souches	références
Les souches gram négatif	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	
Les souches gram positif	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862
Levure	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Tableau 1 :Nature et origine de différentes souches pathogènes utilisées

III.3.1. Milieux de culture et conditions d'incubation

Les milieux de culture utilisés sont le bouillon nutritif (BN) et le milieu Mueller Hinton (MH). L'incubation se fait à 37°C pendant 24 H (Remmal et al. 1993).

III.4. Protocole expérimental

III.4.1. Méthode d'extraction du mucus de l'escargot

Les escargots ont été achetés et conservés à l'intérieur dans un réservoir en plastique transparent (35 x 22 x 14 cm) à température ambiante (~ 210 ° C) et à la lumière ambiante. Ils ont été nourris de feuilles de laitue, de concombre, de carottes et de pommes et ont reçu de l'eau, ainsi qu'une source de calcium. Les réservoirs étaient nettoyés chaque semaine. La production de mucus a été encouragée en prenant chaque escargot individuel et en le stimulant doucement en évaporant 3% de Na Cl. Les sécrétions résultantes ont été recueillies à l'aide de pipettes Pasteur en plastique de 10 ml et regroupées en une aliquote. Le mucus a été laissé se déposer à température ambiante pendant 1 à 2 heures avant dilution à 1:3 dans du PBS et centrifugation à 4500 tr/min pendant 20 minutes. Le surnageant a été utilisé dans des investigations ultérieures (Cilia, 2018).



Figure 18 : l'élevage de l'escargot *Helix aspersa muller*.

III.4.2. Activité antimicrobienne

Le mucus *Helix aspersa* diluée au 1:3 a été testé contre la gamme des 7 souches pathogènes utilisées présentées dans le tableau 1.

a. Réactivation des souches pathogènes et ajustement de l'inoculum

100 μ L de chaque souche ont été inoculés dans 10 mL de bouillon nutritif. Après 24h d'incubation à 37°C, l'inoculum été ajusté à 0,5 MC Ferland (UFC/ml) soit à une D.O qui s'étend de 0,08 à 0,10 à 620 nm (Morsy et al., 2017).



Figure 19: Réactivation les souches.

b. Technique de diffusion en milieu solide (méthode de disques) :

➤ Préparation des disques :

Les disques ont été préparés à partir du papier de wattman N°3 de 5mm de diamètre, les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 20 min. Après stérilisation, ils ont été émargés pendant 15 min dans notre extrait (Saxena et al., 2013).



Figure 20: Méthode des disques.

➤ Protocole

L'activité antibactérienne du mucus a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Nous avons utilisé la méthode de diffusion sur milieu MH pour tester l'effet du mucus. Les boîtes de pétri contenant le milieu de culture ont été ensemencées en nappe avec l'inoculum bactériens (Saxena et al., 2013).

Les disques ont été déposés à la surface du milieu de culture ensuite les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle et exprimés en mm.

Trois disques de test en papier stérile (diamètre 5 mm) ont été appliqués sur chaque plaque et 50mL du surnageant muqueux ont été ajoutés à deux d'entre eux, tandis que le troisième a été traité avec 50mL de PBS comme contrôle (Zlatko. K, 2021).

➤ Analyses biochimiques

Une aliquote de surnageant muqueux *H. aspersa* dilué au 1:3 a été analysée pour la teneur en protéines en utilisant la méthode Biuret. Le résultat a été obtenu en g/L qui a ensuite été calculé en mg/mL pour le mucus non dilué (Remmal et al. 1993).

III.4.3. Activité antioxydante

a- Purification des fractions du mucus d'*Hélix aspersa* :

Le mucus des escargots a été soumis à une ultrafiltration sur des filtres millipores (5, 10 et 30 kDa) pour obtenir des fractions de masse moléculaire différente : fraction 1 (composés avec MW; 5kDa), fraction 2 (composés avec MW; 10 kDa), fraction 3 (composés avec PM < 20 kDa) et Fraction 4 (composés avec PM entre 10 et 30 kDa) (Mencner et al., 2014).

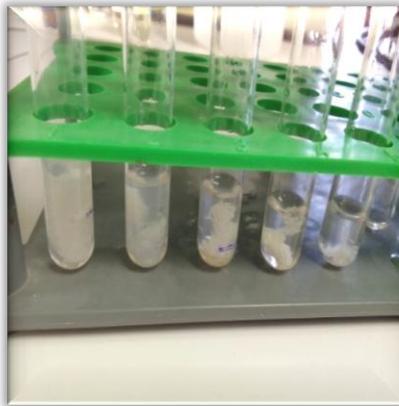
b- Dosage du DPPH :

Chaque fraction a été évaluée pour sa capacité à donner des électrons (ou des atomes d'hydrogène) en utilisant le niveau de blanchiment d'une solution de couleur violette de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) - un radical stable utilisé comme réactif. Un volume de 0,5 ml de chacune des trois fractions a été ajouté à 1 ml de solution de DPPH (100 µM) dans l'éthanol. L'absorbance a été lue contre un blanc à 517 nm, après 30 min de période d'incubation à 37°C. L'inhibition du radical libre DPPH en pourcentage a été calculée selon la formule (figure 23) (Saxena et al., 2013)

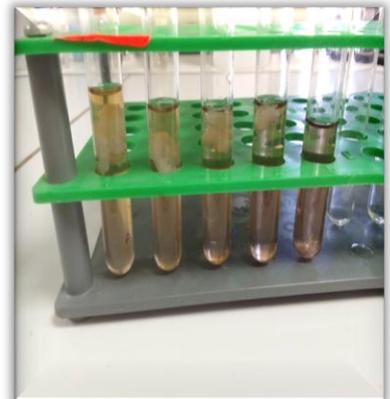
$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{DO Contrôle} - \text{DO échantillon} / \text{DO Contrôle}) \times 100$$



La solution de DPPH.



Le mélange d'essai
contenait le mucus +
éthanol + DPPH



Le mélange d'essai
après l'incubation.

Figure 21 : le dosage du DPPH.

III.4.4. Activité anti-inflammatoire

a. Méthode stabilisation des membranes HRBC :

➤ Préparation des cellules des globules rouges :

Le sang a été prélevé sur un être humain en bonne santé qui n'a pas pris d'anti-inflammatoires. Le sang recueilli a été mélangé avec un volume égal de solution D'alsever (2% dextrose ;0.8% Citrate de sodium ; 0.05% Acide citrique et0.42% chlorure de sodium) (figure 25) .La mixture a été centrifugée à3000 tr/min pendant 10 minet les concentrés de cellules ont été utilisés directement(Khaheshi etal., 2011).

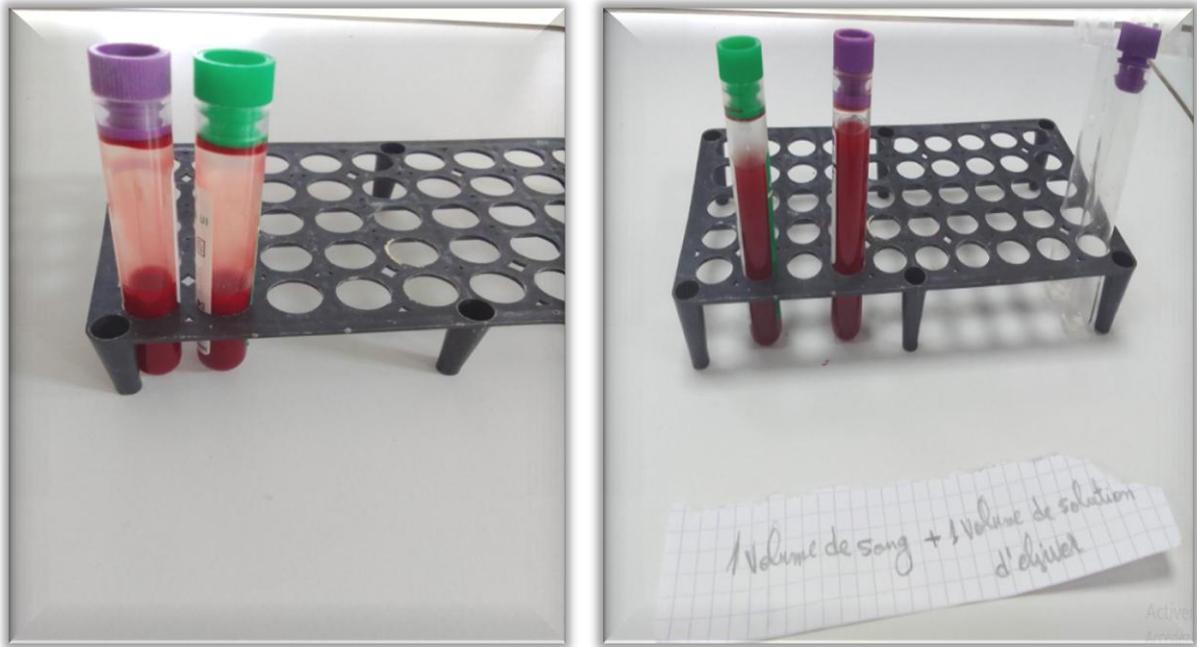


Figure 22:prélèvement sanguin.

➤ **Hémolyse induite par la chaleur :**

Le principe mis en jeu ici est la stabilisation de la lyse de la membrane HRBC induite par une hypotonicité. Le mélange d'essai contenait le mucus (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 μ g/ml) ou le diclofénac, médicament standard à base de sodium (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 μ g/ml), 1 ml de tampon phosphaté (0,15 M, pH 7,4), 2 ml d'hypo saline (0,36 %), 0,5 ml deHRBC, ont été incubés à 37 °C pendant 30 min et centrifugés pendant 20 min à 3 000 tr/min(Khaheshietal., 2011).

La teneur en hémoglobine de la suspension a été estimée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'hémolyse produit en présence d'eau distillée a été mesuré à 100 %(Khaheshiet al., 2011).

➤ **Test d'inhibition de l'albumine :**

L'activité anti-inflammatoire in vitro a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. Les méthodes consistent a préparé trois solutions :

▪ **La solution d'échantillon :**

- 0.5ml, composée de 0.45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA) 5% et 0.05ml du mucus.

▪ **La solution standard:**

- 0.5ml composée de 0.45ml de la solution aqueuse de BSA 5% et 0.05ml de solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 100mg.

- **La solution témoin :**

- 0.5ml composée de 0.45 ml de la solution aqueuse de BSA 5% et 0.05 ml d'eau distillée.

Toutes les solutions ont été ajustées à un pH de 6.3, par une solution d'HCL (IN). Les échantillons ont été incubés à 37° pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min, après le refroidissement des tubes, 2.5ml de la solution tampon phosphate saline (PBS) à (PH = 6.3) ont été ajoutés aux solutions préparées. L'absorbance a été lue par le spectrophotomètre à 660 nm (Negahdari et al 2017).

Le pourcentage de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \frac{(\text{D.O d'échantillon} - \text{D.O du témoin})}{\text{D.O du témoin}} * 100$$

Chapitre IV : Résultats et Discussion

Chapitre IV : Résultats et Discussion

IV.1. Activité antibactérienne du mucus d'*Hélix aspersa muller*

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien du mucus de l'escargot *Hélix aspersa muller* par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé (méthode de disque), Mueller Hinton, c'est le milieu le plus utilisé pour faire ces tests d'antagonisme.

L'activité antibactérienne du mucus de l'escargot *Hélix aspersa Muller* a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant le mucus d'escargot *Hélix Aspersa Muller* à tester vis-à-vis de 07 microorganismes pathogènes qui proviennent de la collection du laboratoire LMBAFS, dont trois (3) bactéries à gram positif (+) : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, et *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, et trois bactéries à gram négatif (-) : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, et *Salmonella typhi* ATCC 6539 ainsi qu'une levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

La meilleure activité antibactérienne a été observée vis-à-vis de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 qui a montré un diamètre d'inhibition 09 ± 1.00 mm, suivi des souches, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 338625, et *Salmonella typhi* ATCC 6539.

Le mucus de l'escargot *Hélix aspersa muller* a montré des diamètres de 08.00 ± 1.53 mm vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* ATCC 338625, *salmonella typhi* ATCC 6539, et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 respectivement (figures 23, 24).

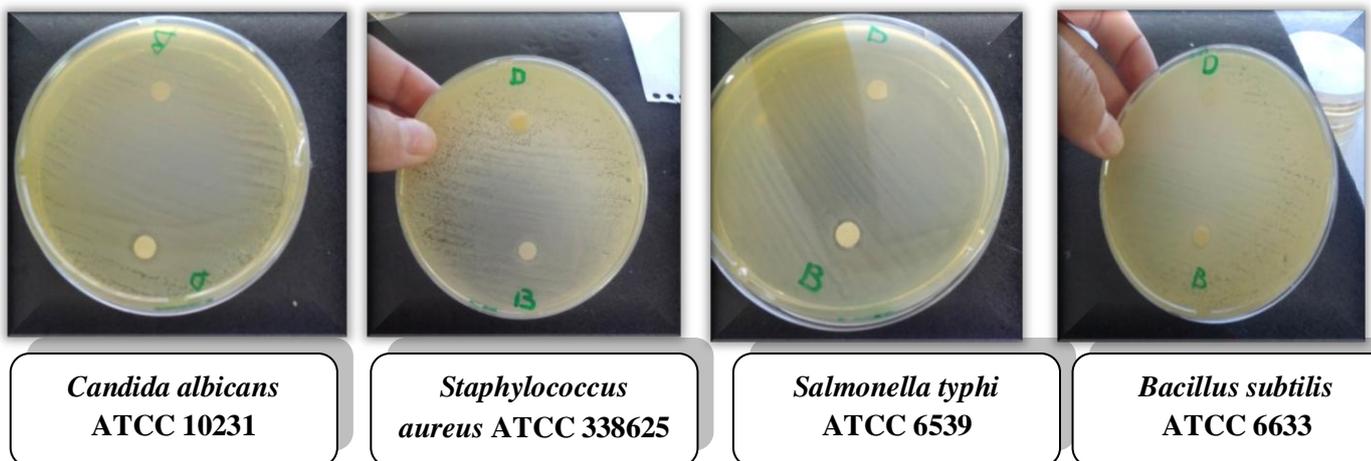


Figure 23 : pouvoir antibactérienne de mucus d'escargot *Hélix aspersa muller* par la méthode de disque (diffusion sur un milieu solide) vis-à-vis de *candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 338625, *Salmonella typhi* ATCC 6539, et *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

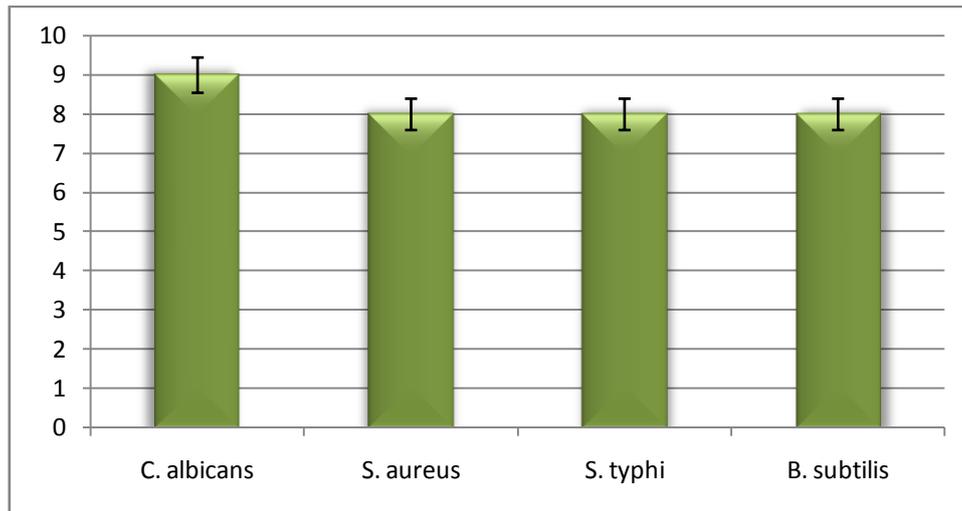


Figure 24 : diamètres d'inhibition du mucus vis-à-vis des souches testées en mm.

Aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée pour les souches *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876 (figure 25 et 36).

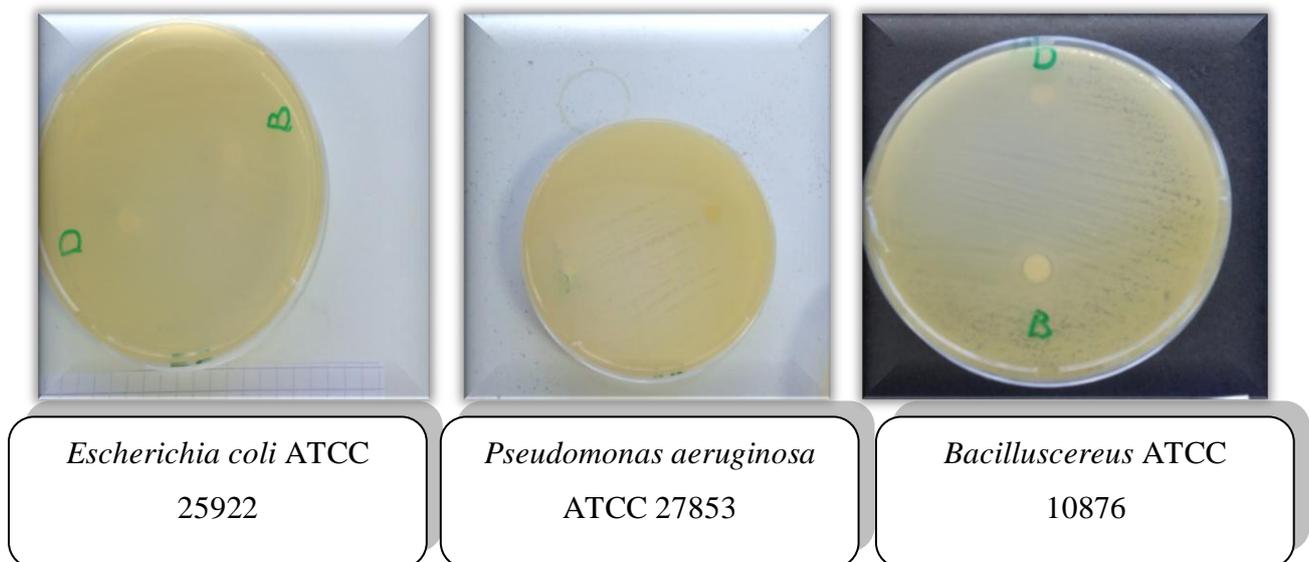


Figure 25 : pouvoir antibactérienne de mucus d'escargot *Hélix aspersa muller* par la méthode de disque (diffusion sur un milieu solide) vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

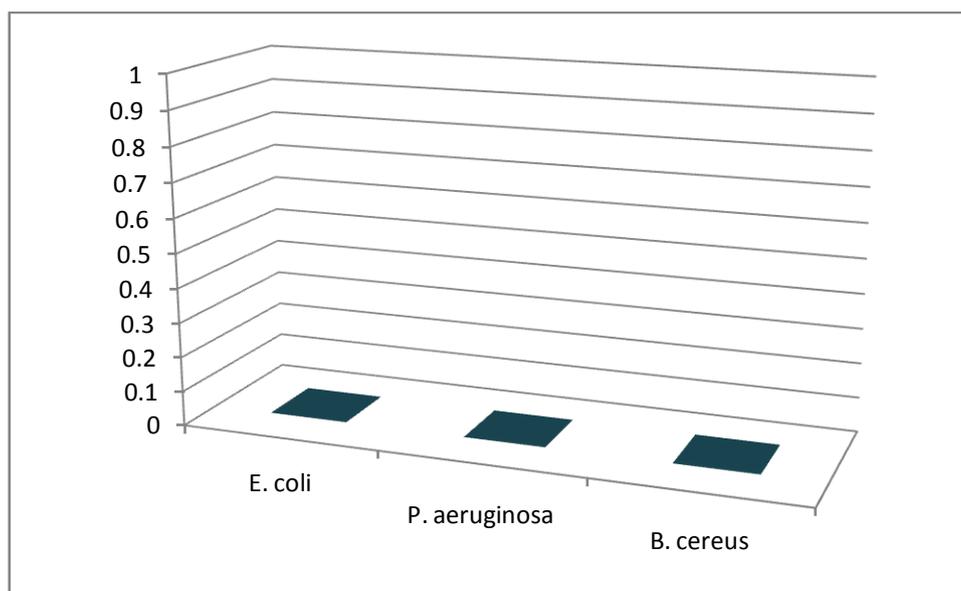


Figure 26 : diamètres d'inhibition du mucus vis-à-vis des souches testées en mm.

Nous remarquons que le diamètre d'inhibition supérieur (09 ± 1.00 mm) a été observé pour la souche *Candida albicans* ATCC 10231, tandis que le diamètre d'inhibition inférieur (faible) (00 ± 00 mm) était observé pour les souches *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Parmi les souches pathogènes testées nous remarquons que les bactéries de Gram+ sont moins résistantes au mucus de l'escargot *Hélix Aspersa muller* aux bactéries de gram⁻.

L'activité antimicrobienne de mucus d'escargot *Hélix aspersa muller* a été testée vis-à-vis des bactéries pathogènes. Cette étude a confirmé que la bave d'escargot pouvait être utilisée pour le traitement de diverses infections, y compris les infections transmises par la peau.

Nos résultats sont comparatifs avec les résultats d'autres travaux (**Huggenberger et al, 2003**) En effet dans leur étude sur le mucus de l'escargot d'*Hélix aspersa muller* ont observé une activité vis-à-vis de certaines bactéries testées.

IV.2. Etude de l'activité antioxydant

IV.2.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényle- picrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez et al, 1998**).

Chapitre IV : résultats et discussion.

L'activité antioxydant de mucus de l'escargot *Helix aspersa muller* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH*) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires.

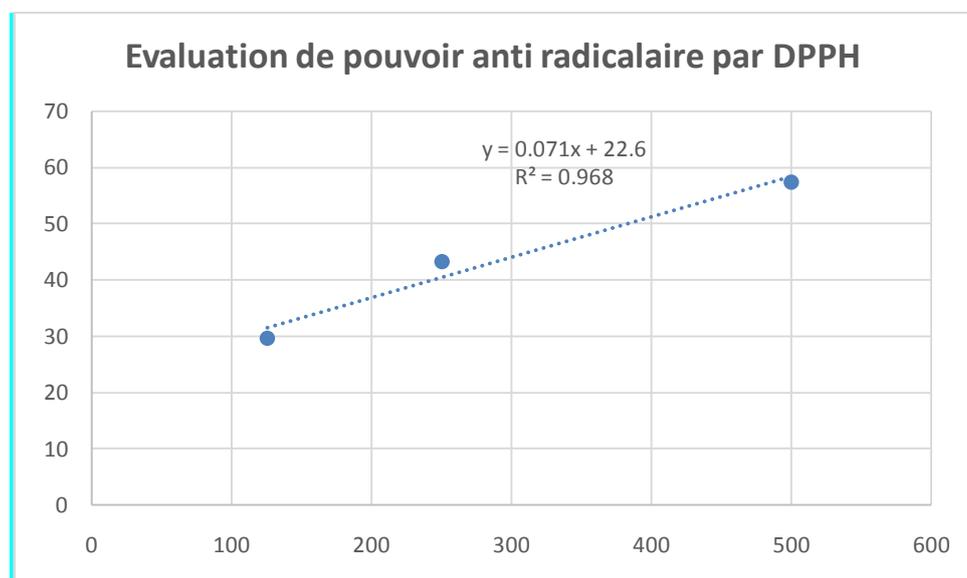


Figure 27 : évaluation de pouvoir anti radicalaire par DPPH

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'EERR. Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC50.

IV.2.2. Evaluation de l'IC50

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydant d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydant d'un composé est élevé (**Pokorny et al, 2001**).

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50 % du radical DPPH a été calculée par régression linéaire des taux d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations des extraits préparés.

D'après l'équation linéaire $Y = 0.116X$, $R^2 = 0.942$ Du graphe des variations du pourcentage en fonction des concentrations de mucus, on calcul IC50 qui est la concentration de mucus qu'il faut pour d'inhibition 50% du radical libre.

$$Y = 0.116x \rightarrow x = 50/0.116 = 431.034482758$$

IV.2.3. Acide ascorbique

Nous traçons le graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'acide ascorbique :

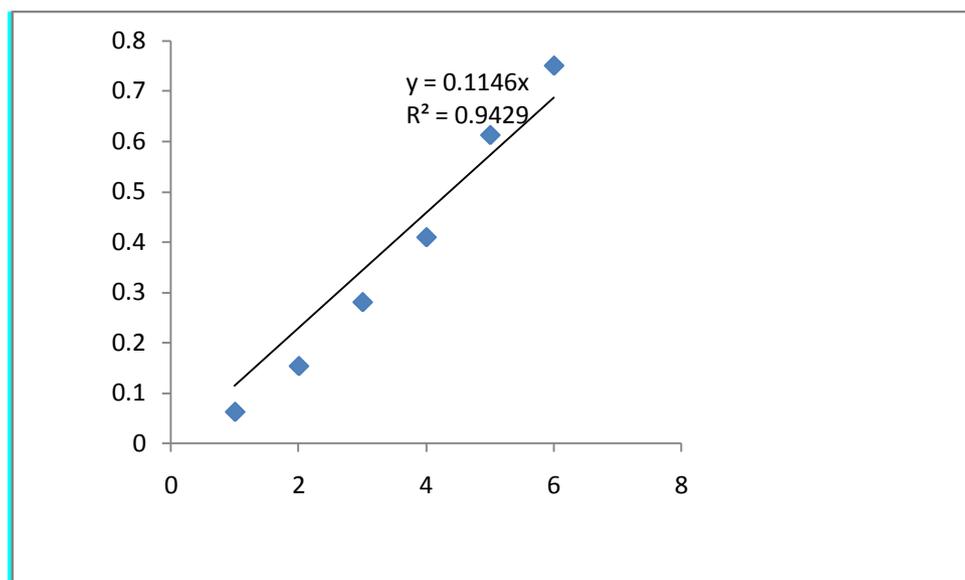


Figure 28: courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

D'après l'équation linéaire $Y = 0,114X$ Du graphe des variations du pourcentage en fonction des concentrations de mucus, on calcul IC_{50} qui est la concentration de mucus qu'il faut pour d'inhibition 50% du radical libre

Le mucus de *Helix aspersa* présentait une activité anti-radicalaire avec une IC de 50% de l'ordre de 431 mg/ml. Comparé à l'antioxydant standard (acide ascorbique) montrant $IC_{50\%} = 436$ mg/ml, nous constatons que notre mucus a une activité antioxydant importante.

IV.3. Activité anti-inflammatoire in vitro

IV.3.1. Test de stabilisation des membranes HRBC

La méthode de la stabilisation des membranes des GRH a été choisie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire du mucus d'*Helix aspersa* in vitro car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomiale et sa stabilisation implique que l' 'extrait peut ainsi stabiliser les membranes lysosomiales. La Stabilisation de la membrane lysosomiale est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomiques des

Chapitre IV : résultats et discussion.

neutrophiles activés tels que les protéases qui provoquent une inflammation des tissus et d'autres dommages lors de la libération extracellulaire (**Shendkar et al, 2014**).

L'hémolyse induite par l'hypotonicité peut découler de la lyse des cellules en raison de la perte de pression osmotique du liquide intracellulaire et des composants électrolytiques. L'extrait peut inhiber les processus (**Suresh et al, 2014**).

Les résultats obtenus illustrés sur la figure 29 montrent que les pourcentages d'inhibition du mucus sont plus importants que ceux observés par le diclofénac donc le pouvoir anti-inflammatoire de mucus s'affiche important et intéressant. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Hininger favier (2014)**.

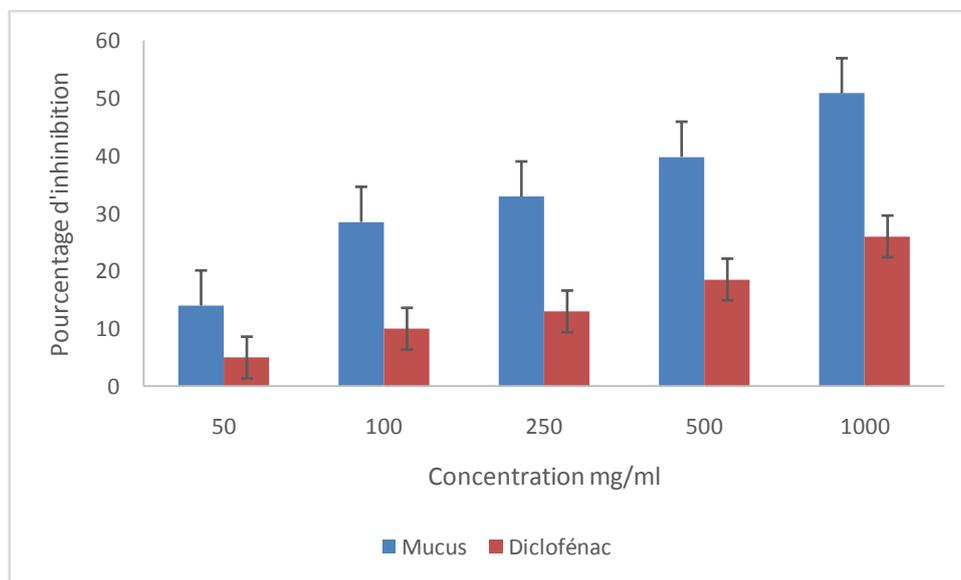


Figure 29: le pourcentage d'hémolyse induite par la chaleur de diclofénac et mucus.

IV.3.2. Test de la dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Bagad et al, 2016**).

Les méthodes actuelles de détection et d'isolement d'un large éventail de composés anti-inflammatoires aux premiers stades du processus de découverte de médicaments utilisent un grand nombre d'animaux. À cet égard, il existe des problèmes éthiques concernant l'utilisation d'animaux aux premiers stades de la découverte de médicaments pour les maladies inflammatoires et dégénératives, à partir de produits naturels, en utilisant des voies d'isolement axées sur l'activité lorsque de nombreux composés, supérieurs à 100, sont présents dans l'extrait brut. Ou fraction (**Suresh et al, 2014**).

Chapitre IV : résultats et discussion.

C'est la raison principale pour laquelle le procédé d'utilisation des effets anti-dénaturants (stabilisants) in vitro de l'ovalbumine traitée thermiquement (immunogènes) comme test de criblage pour la détection de composés anti-inflammatoires est proposé sans l'utilisation d'animaux dans les premières étapes du processus de découverte de médicaments (Suresh et al., 2014).

D'après les résultats affichés sur la figure 30, le mucus d'*Hélix aspersa muller* étudiés inhibe la dénaturation de BSA avec un pourcentage de 21.3%.

Les résultats obtenus pour le mucus est comparable à ceux obtenus pour le diclofénac de sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exercé un pourcentage d'inhibition proche de la concentration de diclofénac (Bonnet et al, 2021).

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines in vivo. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines.

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme la phénylbutazone et L'indomethazine inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (Madec et al, 2019).

D'après les résultats, on constate que le mucus d'escargot *Hélix aspersa muller* est capable de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents mucus des gastéropodes sur l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de la dénaturation des protéines (Rao Bolla et al, 2019).

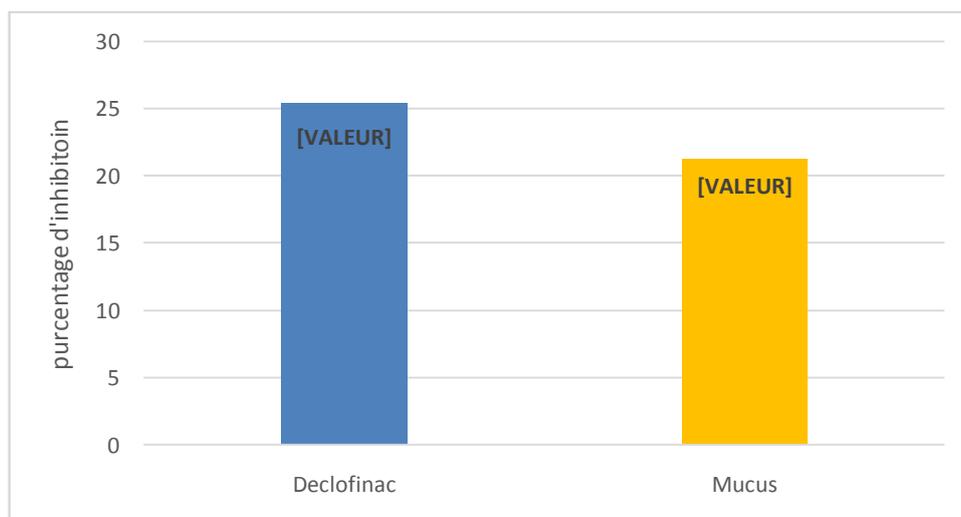


Figure 30 : pourcentage de la dénaturation des protéines.

Chapitre IV : résultats et discussion.

Dans une étude comparative avec d'autres travaux sur le mucus de l'escargot *Hélix aspersa muller*, les résultats obtenus de l'activité antibactérienne et acceptable ainsi que l'activité antioxydant, tandis que les résultats de l'activité anti-inflammatoire sont excellents par rapport aux résultats des autres études (Mannan et al, 2009).

Conclusion

Conclusion

Les gastéropodes possèdent, des propriétés biologiques très importantes dans divers domaines à savoir médical, pharmaceutique, cosmétique et d'agriculture.

Face à de nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens, antioxydants, et anti-inflammatoires disponibles vis-à-vis des maladies infectieuses, parasitaires...etc. qui constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes, antioxydantes et anti-inflammatoire efficaces et qui sont à large spectre d'action.

Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les activités bénéfiques d'*Helix aspersa*. L'objectif principal de ce travail est d'explorer les activités antimicrobiennes, antioxydant, et anti-inflammatoire du mucus de l'escargot *Helix aspersa*.

sur six souches pathogènes (Gram + et Gram -).

L'exploration de l'activité antibactérienne du mucus d'*Helix aspersa* a démontré son potentiel d'inhibition de *Candida albicans* ATCC 10231 (09.00 ± 1.00 mm) qui s'est révélée la plus sensible vis-à-vis de mucus de l'escargot *Helix aspersa muller*, suivi par *Staphylococcus aureus* ATCC 338625, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Par contre, les souches *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Escherichia coli* ATCC 25922 se sont révélés résistants vis-à-vis de mucus d'*Helix aspersa muller*.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de notre mucus a été réalisé par la détermination de son pouvoir de piégeage du radical libre le DPPH. Les résultats obtenus montrent que le mucus d'*Helix aspersa muller* est un antioxydant puissant.

En outre, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire montre que le mucus d'*Helix aspersa* pourrait contenir des molécules bioactives à effets anti-inflammatoire.

On conclut que le mucus de l'escargot *Helix aspersa muller* étudié procède des effets antibactériens, antioxydants et anti-inflammatoires intéressants.

En perspective, il serait nécessaire d'identifier les molécules bioactives du mucus d'*Helix aspersa* et d'explorer d'autres propriétés thérapeutiques de cette gastéropode à savoir : antidiabétique, anti-tumorales,...etc.

Références bibliographiques

A

-Adikwu. M, et U. Alozie, B. Application of snail mucin dispersed in detarium gum gel in wound healing, Scientific Research and Essay , (2007), 2 , 195-198 .

-Ariane Biquand. Les Infections à *Pseudomonas aeruginosa* et leurs traitements, Université Bretagne Loire, Thèse de doctorat 2019.

B

-Bonnet. J.C, Aupinel. P, et Vrillon J.L, L'escargot *Helix aspersa* : biologie-élevage. Institut National de la Recherche Agronomique, Éditions Quae, Paris, (1990).

-Bao. P et al, The role of vascular endothelial growth factor in wound healing, J. Surg. Rés, (2009), 153, 347-358.

C

-Cilia. G, et Fratini. F, Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug mucus, Journal de complément et médecine intégrative, (2018), 15 (3), 1-10

-Céline Couteau, maître de conférences en pharmacie industrielle et cosmétologie et Laurence Coiffard, professeur en galénique et cosmétologie, à l'Université de Nantes.

D

-Dolashka-Angelova. P et al, Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins, Immun. Investir ,(2008), 37 (8), 822-840.

E

-El Zawawy. N, El-Shenody. R, A., Ali. S. S, et El-Shetehy. M, A novel study on the inhibitory effect of marine macroalgal extracts on hyphal growth and biofilm formation of candidemia isolates, Science. Rep, (2020), 10, 93-103.

-Etim. L, Aleruchi. C, et Obande. G, Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection, Journal britannique de recherche en microbiologie, (2016), (11) 2, 1-9.

J

-Jean-Claude Bonnet, Pierrick Aupinel, et Jean-Louis Vrillon, *Hélix aspersa* biologie et élevage. avril 2019.

K

-Khaaheshi. I, et al, Loss of expression of TGF- β s and their receptors in chronic skin lesions induced by sulfur mustard as compared with chronic contact dermatitis patients, *BMC Dermatol*,(2011), 11, 2.

-Kenawy. E et al, Synthesis, characterization and biomedical applications of a novel Schiff base on methyl acrylate-functionalized chitosan bearing p-nitrobenzaldehyde groups, *Int. J. Biol. Macromol*, (2019), 122, 833-843.

L

-Lauth. X et al, Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass, *J. Biol. Chim*, (2002), 227, 5030-5039.

M

-Mannan. A. U, Sharma. S, Ganesan. K, et Total, R. N. A. Isolation from recalcitrant yeast cells, *Anal. Biochimie*, (2009), 77 (79), 389.

N

-Negahdari. S, Galehdari. H, Kesmati. M, Rezaie. A, et Shariati. G, Wound healing activity of extracts and formulations of *Aloe vera*, *henna*, *Adiantum capillus-veneris*, and myrrh on mouse dermal fibroblast cells, *Int. J. Préc. Méd*, (2017) , 8, 18.

O

-Ortega MP, García. M, Cánoves Escolano. A, Blasco. S. P, et García. M. L, Tratamiento efectivo con un ungüento de glicina y prolina en un caso de úlceras recurrentes por déficit de prolidasa, *Cultiver. Hôpital*, (2006), 30 (5), 304-308.

P

-Institut pasteur paris 25-28 Rue du Dr Roux, 75015 Paris 01 45 68 80 00 janvier 2021.

R

-Rao Bolla. S, In vitro wound healing potency of methanolic leaf extract of *Aristolochia saccata* is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression, *Héliyon*, (2019), 5 (5), 44–58.

S

-Saxena. N, Dadhich. D, Maheshwari. D, Aerobic bacterial isolates from burn wound infection patients and their antimicrobial susceptibility pattern in Kota, *J. Evol. Méd. Bosse. Sci*, (2013), 23 (2) 4156-4160.

-Schileyko. A, Treatise on recent terrestrial pulmonate molluscs, *Ruthenica Suppl*, (2000), 2, 731, 880.

-Skehan. P et al, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Institut de cancérologie*, (1990), 82 (13), 1107-1112.

-Smith. AM, et Morin. MC, Biochemical differences between trail mucus and adhesive mucus from marsh periwinkle snails, *Biol Taureau*, (2002), 203, 338-346.

T

-Trapella. C et al, Helix Complex snail mucus exhibits pro-survival, proliferative and pro-migration effects on mammalian fibroblasts, *Sci. Rep*, (2018), 8 (1), 17-27.

V

-Viani. F et al, Synthesis and anti-bacterial activity of a library of 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one derivatives amenable of crosslinking to polysaccharides, *Tétraèdre*, (2017), 73, 1745-1761.

Y

-Yang. F et al, Synthesis and biological evaluation of thiophene-based hydroxamate derivatives as HDACis with antitumor activities, *Chim*, (2020), 12 (8) 655-672.

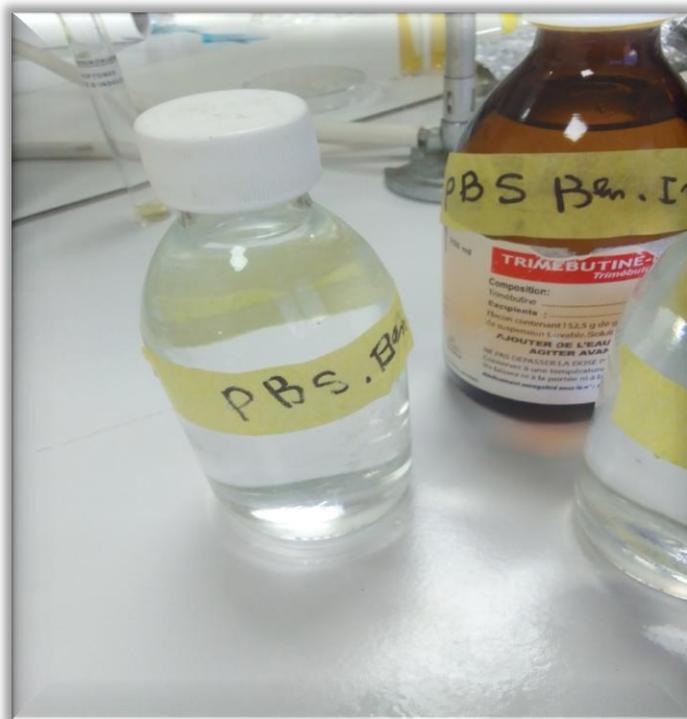
Z

-Zlatko. K, Commentary Development of next-generation antimicrobial hydrogel dressing to combat burn wound infection, *Biosci. Rep*, (2021), 41, 202-209.

Annexes

Préparation de PBS :

- Préparez 800 mL d'eau distillée dans un récipient approprié.
- Ajoutez 8 g de Chlorure de sodium à la solution.
- Ajoutez 0,2 g de chlorure de potassium à la solution.
- Ajoutez 1,44 g de phosphate de sodium dibasique à la solution.
- Ajoutez 0,245 g de Potassium Phosphate Monobasique à la solution.
- Ajuster la solution au pH souhaité (généralement $\text{pH} \approx 7,4$).
- Ajoutez de l'eau distillée jusqu'à ce que le volume soit 1 L.



Le tampon PBS

Préparation de Mueller Hinton

Extrait de viande.....	03g
Tryptone.....	17.5g
Amidon.....	1.5
Agar.....	8g pour MH semi-solide et 16g pour MH gélosé
Ph.....	7.3 ± 0.2

La composition de milieu de culture, est calculée pour un litre de milieu de culture.