

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

- BENABDESSELAM Linda
- BENAÏSSA Nabila
- BENAÏCHOUCHE Madjida

Thème

**Contribution à l'étude de l'impact d'un fongicide sur le
microbiote intestinal murin**

Soutenu le: 12/07/2021

Jury :

Grade

Président : Mme OULBACHIR k

Professeur

Encadrant : Mme BOUDALI S

MAA

Co-encadrant : Mme BENARABA R

Professeur

Examinatrice : Mme BENGUIAR R

MCB

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu de nous avoir donné le courage et la foi pour mener à bien ce travail, malgré tous les obstacles.

Nos sincères remerciements s'adressent à Notre promotrice BOUDALI Souad pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses orientations et ses conseils qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous remercions professeur BENARABA Rachida, qui nous a fait l'honneur d'être la Co-promotrice de ce projet, pour ses aides, ses conseils et ses orientations.

Nous remercions aussi les membres de jury Madame OULBACHIR Karima et Madame BENGUIAR Rachida pour avoir accepté de juger et d'examiner notre travail.

Un grand merci à monsieur Moustapha, monsieur Redouane, madame Lila et à toute l'équipe du laboratoire hygiène et pathologie animale de l'Institut des Sciences Vétérinaires, « Université Ibn Khaldoun -Tiaret ».

Nos grâtes remerciements à Monsieur HOCINE Laredj le chef de spécialité microbiologie appliquée pour son aide et son soutien et nous avoir fait profiter de ses connaissances.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et l'ensemble des enseignants qui nous ont suivies tout au long du cursus

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail

A la mémoire de mes chers grands-parents.

A mes très chers parents.

A mes chers frères : Nabil et Nassim.

*A ma grande famille : mes tantes, mes oncles ainsi que
mes cousines et cousins.*

A tous mes amies en particulier Nabila et Madjida.

A tous mes enseignants.

A tous ceux que j'aime.

Linda BENABDESSELAM

Dédicace

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance à Dieu le tout-puissant pour m'avoir accordé la vie, la santé, la paix et la patience afin d'arriver à réaliser ce travail.

Je dédie ce mémoire

À mes chers parents pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement. Ma reconnaissance entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude. Que Dieu vous bénisse et vous protège.

À mon frère Abdelkader

À tous les membres de ma famille Qui m'ont soutenue tout au long de ma vie.

À mes chers amis Hakima. Manel.

À mon trinôme Linda et Nabila.

BENAICHOUCHE Madjida

Dédicace

*Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux
qui me sont chers*

*A mes chers **parents**, Secret de ma force et lanterne de ma vie,*

*A mes chères sœurs **Siham, Marwa et Tasnim***

*A mes chers frères **Tariq, Abdou, Wahid, Ahmed et Younes***

*A ma précieuse famille <<**BENAISSA et CHADLI**>>*

*À toi **Safia**, partie très tôt*

Tu étais, tu es et tu seras à jamais dans mon cœur et mon esprit.

*A mes chères amies **Hayouta, kheira, nouria, zehor, Maha et
keltoum.***

*Sans oublier mon trinôme **Linda et Madjida.***

*A tous mes enseignants et professeurs de mon parcours scolaire
et universitaire.*

A tous ceux qui m'aiment de près ou de loin.

Nabila BENAISSA

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION	

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Polluant	02
I.1.1 Fongicide	02
I.1.2. Tébuconazole	02
I.1.3. Impact du tébuconazole – Toxicité	02
I.2. Microbiote intestinal	03
I.2.1. Définition et composition	03
I.2.2. Répartition	03
I.2.3. Fonctions majeures	04
I.2.3.1 Microbiote intestinal et système immunitaire	04
I.2.3.1.1. Effet barrière	04
I.2.3.1.2. Effet sur le développement et la maturation	05
I.2.4. Facteurs influençant l'installation du microbiote	05
I.2.4.1. Mode d'accouchement	05
I.2.4.2. Allaitement	05

I.2.4.3. Mode d'alimentation	05
I.2.4.4. Environnement	06
I.5. Dysbiose	06
I.6. Effet des polluants environnementaux sur le microbiote intestinal	06

CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES

II. Matériel et Méthodes	08
II.1. Objectif du travail	08
II.2. Date et lieu de travail	08
II.3. Matériel et produits utilisés	08
II.3.2. Matériel biologique	09
II.4. Protocole expérimental	10
II.5. Méthodes	11
II.5.1.1. Etude de l'impact du fongicide (tébuconazole) sur la composition de la flore intestinale	11
II.5.1.1.1. Dénombrement des bactéries dans les échantillons de matière caecale	11
II.5.1.1.1.1 Flore mésophile aérobie totale (FMAT)	11
II.5.1.1.1.2 Entérobactéries	11
II.5.1.1.1.3 Dénombrement des Staphylocoques	12
II.3.2.2. Isolement des microorganismes	12
II.3.2.3. Tests d'Identification des bactéries recherchées	13
II.3.2.3.1 Critères morphologiques	13

II.3.2.3.2 Caractères biochimiques	13
II.3.2.3.2.1 Test de Catalase	13
II.3.2.3.2.2 Test d'Oxydase	14
II.3.2.3.2.3 Test d'ONPG (orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside)	14
II.3.2.3.2.4 Test de Coagulase	14
II.3.2.4 Identification par la galerie Api 20E	15

CHAPITRE III : RÉSULTATS & DISCUSSION

III .1. Dénombrement des bactéries dans les échantillons de la matière caecale	16
III .1.1 Dénombrement de la Flore mésophile aérobie totale	16
III .1.2 Dénombrement des <i>Entérobactéries</i>	17
III.1.3 Dénombrement des <i>Staphylocoques</i>	18
III.2 Identification des bactéries isolées à partir des échantillons de matière caecale	19
III.2.1 Identification des <i>Entérobactéries</i>	19
III.2.2 Identification des <i>Staphylocoques</i>	22
Discussion générale.....	23
Conclusion.....	26
Références bibliographiques.....	
Annexes.....	

Liste des Tableaux

Tableau n° 01 :	Appareillage, verrerie et produits utilisés	08
Tableau n° 02 :	Critères morphologiques des <i>Entérobactéries</i> isolés du contenu caecal	19
Tableau n° 03 :	Caractères biochimiques des <i>Entérobactéries</i> isolés du contenu caecal	20
Tableau n° 04 :	Caractères morphologiques et biochimiques des <i>Staphylocoques</i> et <i>Bacillus</i> isolés du contenu caecal	22

Liste des Figures

Figure n° 01 :	Composition du microbiote intestinal	03
Figure n° 02 :	Répartition de microbiote dans le tube digestif	04
Figure n° 03 :	Effets de différents types de polluants environnementaux sur le microbiote intestinal et leurs résultats ultérieurs	07
Figure n° 04 :	Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale	10
Figure n° 05 :	Isolement et purification des bactéries	12
Figure n° 06 :	Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale chez les rats exposés aux TEB et au BPA durant les 16 semaines de traitement	16
Figure n° 07 :	Dénombrement des <i>Entérobactéries</i> chez les rats exposés aux TEB et au BPA durant les 16 semaines de traitement	17
Figure n° 08 :	Dénombrement des <i>Staphylocoques</i> chez les rats exposés aux TEB et au BPA durant les 16 semaines de traitement	18

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

AMY : Amygdaline

API 20E : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

ARA : Arabinose.

BPA : Bisphénol A

C° : Degrés Celsius

CIT : Citrate de sodium

DO : Densité optique

FAMT : Flore aérobie mésophile totale

GEL : Gélatine.

GLU : Glucose.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂S : Sulfure d'hydrogène

IND : Indole.

INO : Inositol

LDC : Lysine DéCarboxylase.

MAN : mannose

MEL : melibiose

ml : millilitre

ODC : Ornithine decarboxylase

ONPG : Ortho-Nitrophényl-β-galactoside

PCA : Plate Count Agar

RHA : Rhamnose

SOR : Sorbitol

TDA : Tryptophane Désaminase

TEB : Tébuconazol

UFC/ ml : Unité formant colonie /millilitre

URE : Uréase

VP : Vogues Proskauer

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal est un écosystème dynamique désigne les communautés de micro-organisme qui résident ou transitent dans le tube digestif (**Marteau, 2013**), jouant un rôle prépondérant dans de nombreuses fonctions physiologiques de l'hôte ; digestion des polysaccharides, des glycosaminoglycanes et des glycoprotéines, biosynthèse de vitamines, métabolisme des sels biliaires, de certains acides aminés et des xénobiotiques. Il contribue aussi à la maturation du système immunitaire et assure une barrière directe contre la colonisation par des agents pathogènes (**Debré et Legall, 2014 ; Gamet, 2019**).

De nombreuses études ont montré qu'un grand nombre de pathologies humaines digestives et extradiigestives sont associées à une dysbiose du microbiote intestinal c'est-à-dire à une altération de la composition et de l'abondance des populations bactériennes. Le microbiote intestinal pourrait donc être impliqué dans l'apparition et/ou l'évolution de ces maladies. Différents facteurs sont susceptibles d'entraîner une modification de la structure du microbiote intestinal, Parmi ces facteurs, la qualité de l'environnement semble jouer un rôle important. (**Ribiere, 2015**). Des études épidémiologiques ont en effet établi un lien entre plusieurs pathologies caractérisées par une dysbiose et les polluants environnementaux biologiquement actifs, essentiellement les produits phytosanitaires, l'exposition chronique à ces polluants semblerai augmenté la prévalence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn) l'obésité, le diabète de type 1 et 2, la maladie cœliaque, l'atopie, l'asthme, les troubles du spectre autistique, la maladie de Parkinson, la démence de type Alzheimer, certains processus de cancérogénèse digestive, certaines pathologies cardiovasculaires et certaines infections intestinales (**Marchesseau, 2019 ; Lallès, 2013**). Toutefois l'impact direct des faibles doses, de l'ordre de la DJA, de ces polluants sur le microbiote intestinal est sous-évalué, méconnu et de plus en plus remis en question. D'autant plus que ces produits et même à des faibles doses sont responsables de l'apparition de perturbations du système endocrinien et nerveux chez l'animal ce qui représente des signaux d'alarme quant à leur l'usage systématique (**Poulier, 2014**).

Le présent travail a pour objectif d'étudier l'effet d'une exposition chronique à une faible dose du Tébuconazole ; un fongicide systémique de la famille des triazoles, sur microbiote intestinal des rats *wistar*.

Chapitre I :
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Polluant

Le polluant est une substance introduite dans le milieu par l'homme, directement ou indirectement, qui entraîne des effets délétères pour les ressources vivantes, la santé humaine, l'équilibre du milieu, les activités récréatives (**Amiard, 2011**).

Les polluants organiques des sols proviennent principalement de trois ensembles d'activités : industrielles (production d'énergie, métallurgie, industries chimiques), urbaines (transports, gestion et traitement des déchets), et agricoles (utilisation de produits phytosanitaires) (**Barriuso et al., 1996**).

Parmi les produits phytosanitaires on cite : Insecticides, Fongicides, Herbicides.

I.1.1. Fongicide

Les fongicides agricoles permettent de combattre les champignons phytopathogènes susceptibles de provoquer des dégâts sur les plantes cultivées et les récoltes. Les pertes potentielles provoquées par les maladies fongiques sont estimées entre 10 et 30%. En dehors des effets quantitatifs, il existe des champignons pouvant affecter les qualités des productions végétales comme la présence de mycotoxines toxiques pour l'homme, ou des altérations organoleptiques comme la présence de *Botrytis cinerea* sur le raisin (**Batsch, 2011**).

I.1.2. Tébuconazole

Le tébuconazole [(RS)-1-p-chlorophényl-4,4-diméthyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylméthyl) - pentan-3-ol] est un fongicide systémique commercialisé pour la première fois par Bayer AG, en Afrique du Sud, en 1988. Ce fongicide foliaire est connu pour sa pénétration rapide dans la feuille, suivie par sa migration lente et régulière vers l'intérieur de la plante. Plutôt lipophile, il est peu soluble dans l'eau. Ayant un risque de volatilisation relativement modéré, ce composé, solide à température ambiante, est très stable à l'hydrolyse et la photolyse (**Youness, 2013**).

I.1.3. Impact du tébuconazole – Toxicité

Le tébuconazole est considéré comme modérément toxique avec des DL50 chez le rat de 1,7 g/kg par voie orale et supérieure à 2 g/kg par contact avec la peau. Cependant, plusieurs études ont montré son potentiel à risques, notamment lors d'une exposition prénatale, sur l'apprentissage cognitif, le développement de neuropathologies ou en tant que perturbateur

endocrinien. Il a également un impact important sur les microorganismes aquatiques et terrestres, notamment à long terme (Youness, 2013).

I.2 Microbiote intestinal

I.2.1. Définition et composition

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe qui comprend l'ensemble des êtres unicellulaires hébergés dans le tube digestif, principalement des bactéries mais aussi des virus, des champignons et des archées (Landman et Quévrain, 2016). Des relations symbiotiques sont établies entre ces micro-organismes résidents et l'hôte (Debré et Legall, 2014).

Le microbiote intestinal se divise en trois phyla bactériens majeurs : les *Actinobacteries*, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*. Le plus imposant est le phylum des *Firmicutes* avec plus de 200 genres différents. Par ailleurs, même s'ils sont nettement moins représentés, on dénombre une cinquantaine de phyla différents comme les *Proteobacteria*, les *Verrucomicrobia*, les *Fusobacteria* ou les *Cyanobacteria* (Simon, 2016).

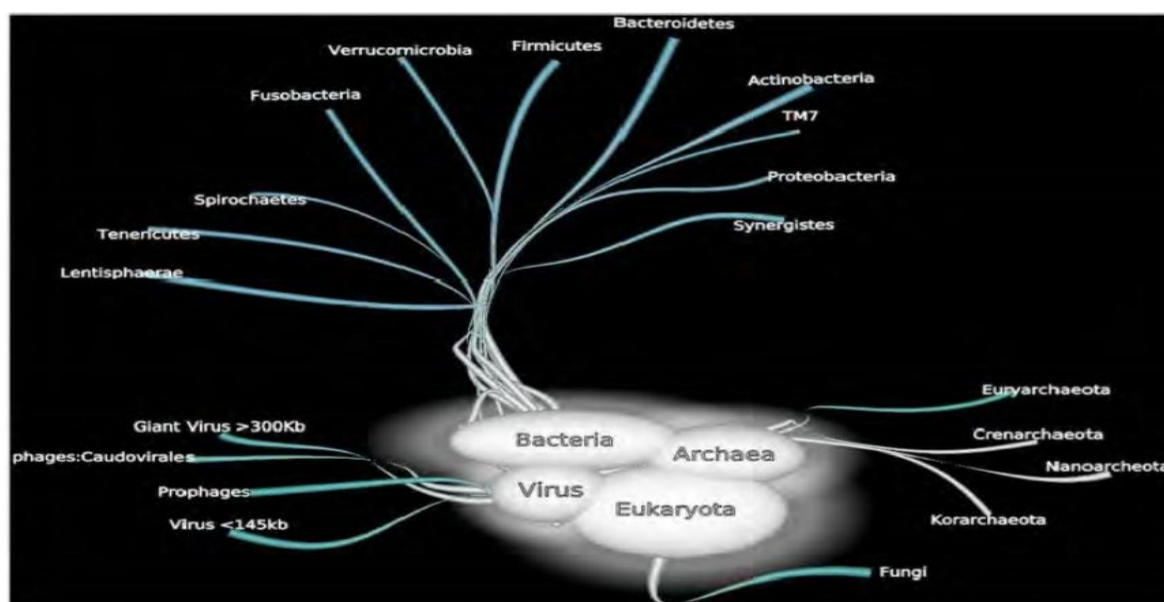


Figure n°01 : Composition du microbiote intestinal (Lagier et al., 2012).

I.2.2. Répartition :

Des variations qualitatives et quantitatives de la flore intestinale sont observées tout au long du tube digestif de la bouche à l'anus. La flore buccale est très diversifiée et comprend des bactéries aérobies et anaérobies, la flore gastrique est en revanche limitée

quantitativement et qualitativement. Les concentrations varient de manière croissante, en effet, au niveau de l'estomac il y a quelques centaines de bactéries par gramme de contenu alors qu'au niveau du côlon distal on retrouve 10^{11} bactéries par gramme de contenu (**Dolié, 2018**).

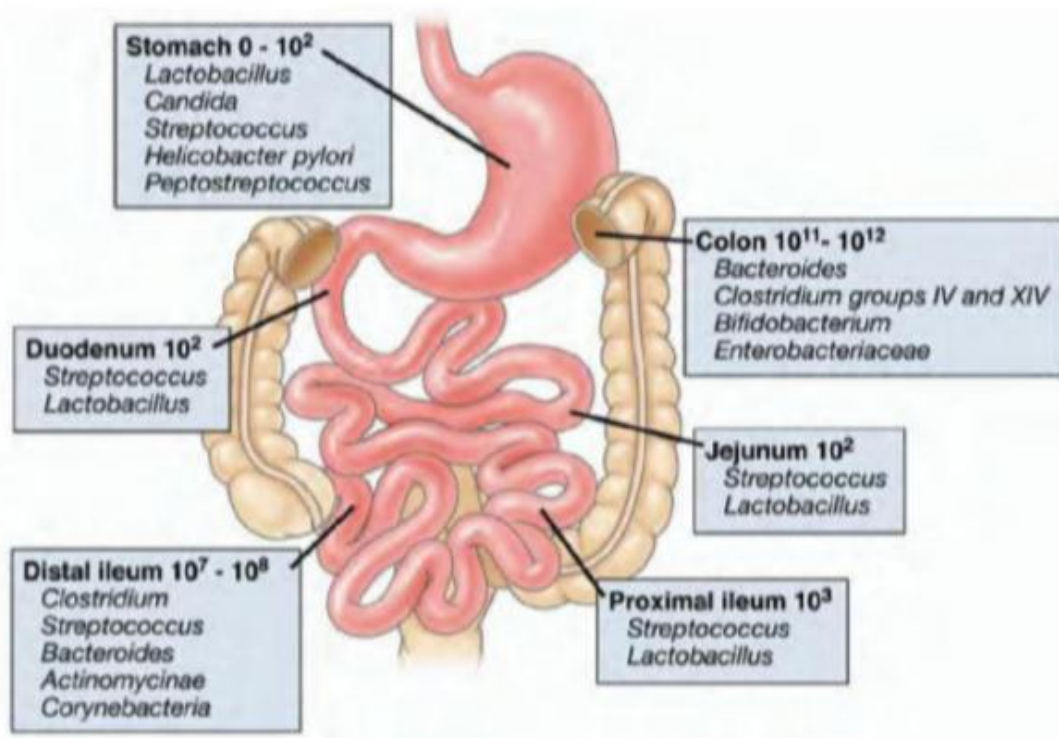


Figure n°02 : Répartition de microbiote dans le tube digestif (**Sartor, 2008**).

I.2.3. Fonctions majeures

I.2.3.1. Microbiote intestinal et système immunitaire

I. 2.3.1.1. Effet barrière

Afin d'assurer l'homéostasie et d'empêcher le développement de pathogènes, la muqueuse intestinale a développé plusieurs systèmes de défense, largement sous le contrôle du microbiote intestinal (**Chevalier, 2018**).

Le microbiote intestinal Permet de limiter la colonisation par des bactéries pathogènes. L'équilibre du microbiote intestinal résulte des interactions microbiennes sous la forme de compétitions pour les substrats nutritifs ou les sites d'adhérence, et de modifications de l'environnement intestinal par des produits du métabolisme bactérien : pH colique, bactériocines, acides organiques, etc (**Goulet, 2012**).

I.2.3.1.2. Effet sur le développement et la maturation

Des études comparatives entre des souris axéniques et conventionnelles ont démontré le rôle essentiel joué par le microbiote dans le développement et la maturation du système immunitaire et donc sur ses fonctions. Les animaux axéniques ont en effet de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : Hypoplasie des plaques de Peyer, nombre de lymphocytes intraépithéliaux réduits, concentration d'immunoglobulines sériques et production de cytokines limitées (**Quévrain et Seksik, 2013**).

I.2.4. Facteurs influençant l'installation du microbiote

I.2.4.1. Mode d'accouchement

Le mode d'accouchement constitue un facteur déterminant dans la colonisation initiale du tube digestif du nouveau-né. L'accouchement par voie basse favorise la colonisation par des germes maternels d'origine vaginale et fécale tels que *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Prevotella* et *Enterobacter*. Lors d'un accouchement par césarienne, le nombre de *Bifidobacterium* et de *Bacteroides* colonisant l'intestin est moindre. L'environnement hospitalier est le premier contact avec la peau humaine favorisant la colonisation par les genres *Staphylococcus*, *Propionibacterium* et *Corynebacterium* (**Marchesseau, 2019**).

I.2.4.2. Allaitement

L'allaitement permet d'augmenter l'implantation du germe *Bifidobacterium* chez le nouveau-né tétant sa mère par rapport à l'enfant prenant du lait de vache. Ce développement serait dû à la présence d'oligosaccharides particuliers dans le lait maternel voir même la présence de *Bifidobactéries* (**Simon, 2016**).

I.2.4.3. Mode d'alimentation

L'alimentation constitue une partie du substrat énergétique du microbiote intestinal. Elle module des processus physiologiques impactant le microbiote (sécrétion d'enzymes digestives, de mucus, vitesse du transit, système immunitaire...). De ce fait, l'alimentation est un des déterminants majeurs de la modulation du microbiote intestinal et le régime alimentaire, qu'il soit bénéfique ou néfaste. Lors de la diversification alimentaire du nourrisson, les deux principaux phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* surpassent en nombre ainsi qu'en diversité les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria* implantés précédemment (**Chaneyackfa, 2017**).

I.2.4.4. Environnement

L'environnement joue un rôle important dans la colonisation intestinale. Certaines études ont mis en évidence la colonisation à plus haut niveau et plus fréquente chez les enfants nés dans les pays en voie de développement par les *Bifidobactéries*. Ces différences de flore sont vraisemblablement liées aux conditions plus strictes d'hygiène entourant les accouchements dans les pays industrialisés, réduisant l'exposition de l'enfant aux flores fécale et vaginale de sa mère (**Campeotto et al., 2007**).

I.5. Dysbiose

La dysbiose est un déséquilibre du microbiote associé à des conséquences néfastes pour son hôte. La composition du microbiote va se modifier et des germes potentiellement nocifs vont apparaître en plus grande quantité. Les principales causes de dysbiose sont les infections virales, bactériennes ou parasitaires, les changements brutaux d'alimentation, les déficits immunitaires et d'utilisation de médicaments pouvant modifier la flore intestinale (**Olives, 2013**).

I.6. Effet des polluants environnementaux sur le microbiote intestinal

Les polluants environnementaux perturbent la composition du microbiome intestinal et modifient directement les profils des métabolites du microbiote. Généralement, le système immunitaire est le premier site d'influence le microbiote et de ses métabolites. Par le biais des métabolites du système immunitaire et du microbiote, la pollution de l'environnement pourrait influencer davantage le métabolisme énergétique, le système endocrinien, le système nerveux, le système cardiovasculaire, etc. En conséquence, différents phénotypes nocifs seront induits par l'exposition à des polluants environnementaux particuliers. Pire encore, certains phénotypes pourraient influencer le microbiote intestinal (**Jin et al., 2017**).

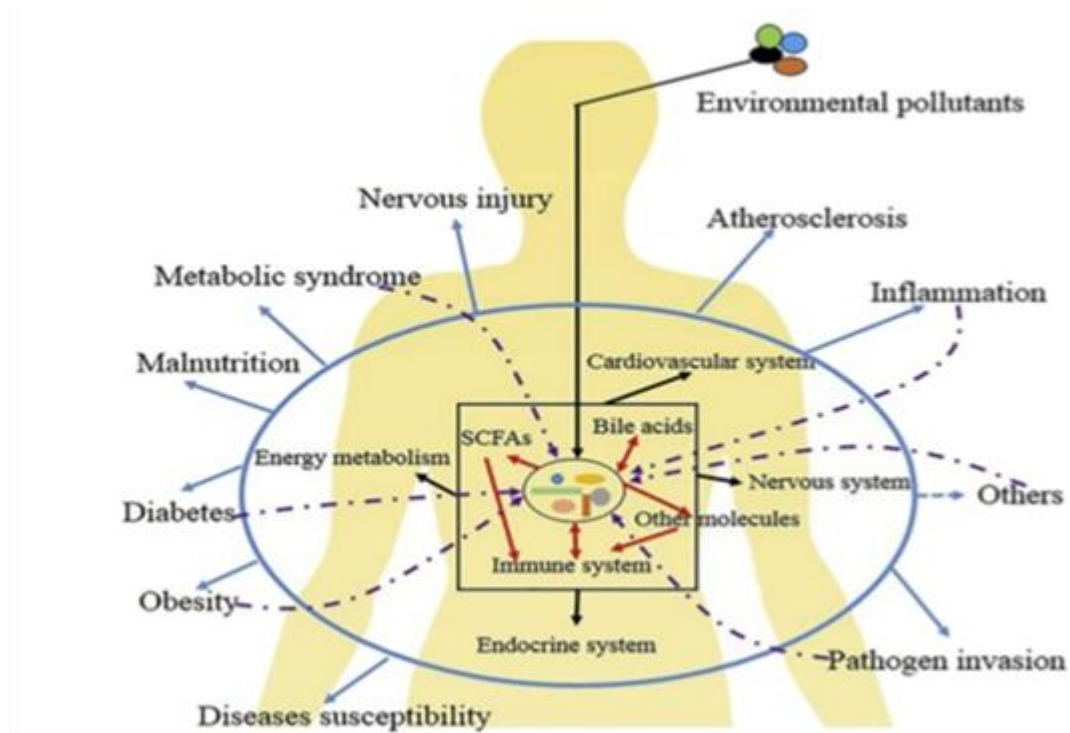


Figure n°03 : Effets de différents types de polluants environnementaux sur le microbiote intestinal et leurs résultats ultérieurs (Jin et al., 2017).

Chapitre II :

MATÉRIEL & METHODES

II. Matériel et Méthodes

II.1. Objectif du travail

La présente étude a eu comme objectif l'évaluation de l'impact de deux polluants environnementaux à savoir le Bisphénol A et le Tébuconazole sur le microbiote intestinal des rats Wistar exposés à de faibles doses correspondant aux doses journalières tolérables définies chez l'homme. Ceci à travers la quantification et l'identification des bactéries contenues dans ce microbiote

II.2. Date et lieu de travail

L'expérimentation relative à cette présente étude à été réalisée sur une période allant du 28 Février 2021 au 30 Mai 2021, elle a été effectuée au sein des laboratoires suivants

-Laboratoire d'Hygiène et Pathologie Animale de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université Ibn Khaldoun -Tiaret.

-Laboratoire d'Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales, Université Ibn Khaldoun -Tiaret.

II.3. Matériel et produits utilisés

Matériel, produits chimiques et milieux de culture utilisés au cours de cette étude sont représentés dans le tableau n° 01.

Tableau n° 01 : Appareillage, verrerie et produits utilisés.

Milieux de cultures	Produits et réactifs	Matériel et appareillages
- Gélose PCA (Plate Count Agar)	- Alcool 95°	- Agitateur magnétique thermique (Ikamag)
- Milieu Chapman	- Eau Oxygénée	- Autoclave (Sanoclave)
- Milieu MacConkey	- Eau physiologique (9g/ L)	- Bain Marie (Gfl)
	- Fuchsine	- Balance Analytique (Dhaus Pioneer)
	- Galerie Api 20E	- Bec Bunsen
	- Huile de paraffine	- Boîtes de Petri
	- Lugol.	- Etuve (Memmert)
	- Réactif de Kovacs	- Four Pasteur (Nüve)
	- Réactifs Voges Proskauer (VP I et VP II)	- Micropipette (Acummax)
	- Huile d'immersion	- Microscope photonique (Zeiss)
	- Violet de Gentiane	- Spectrophotomètre UV-Vis (Optizen 1412v)
	-TDA	
	- Perchlorure de fer	

II.3.1.2. Matériel biologique

Des échantillons de matière caecale ont été prélevés à partir des rats *Wistar* femelles exposés ou non à des doses journalières de Bisphénol A (50ug/kg/j) et de Tébuconazole (30ug/kg/j) pendant 16 semaines. Ces échantillons ont été conservés au congélateur à -20°C préalablement au travail.

II.4. Protocole expérimental

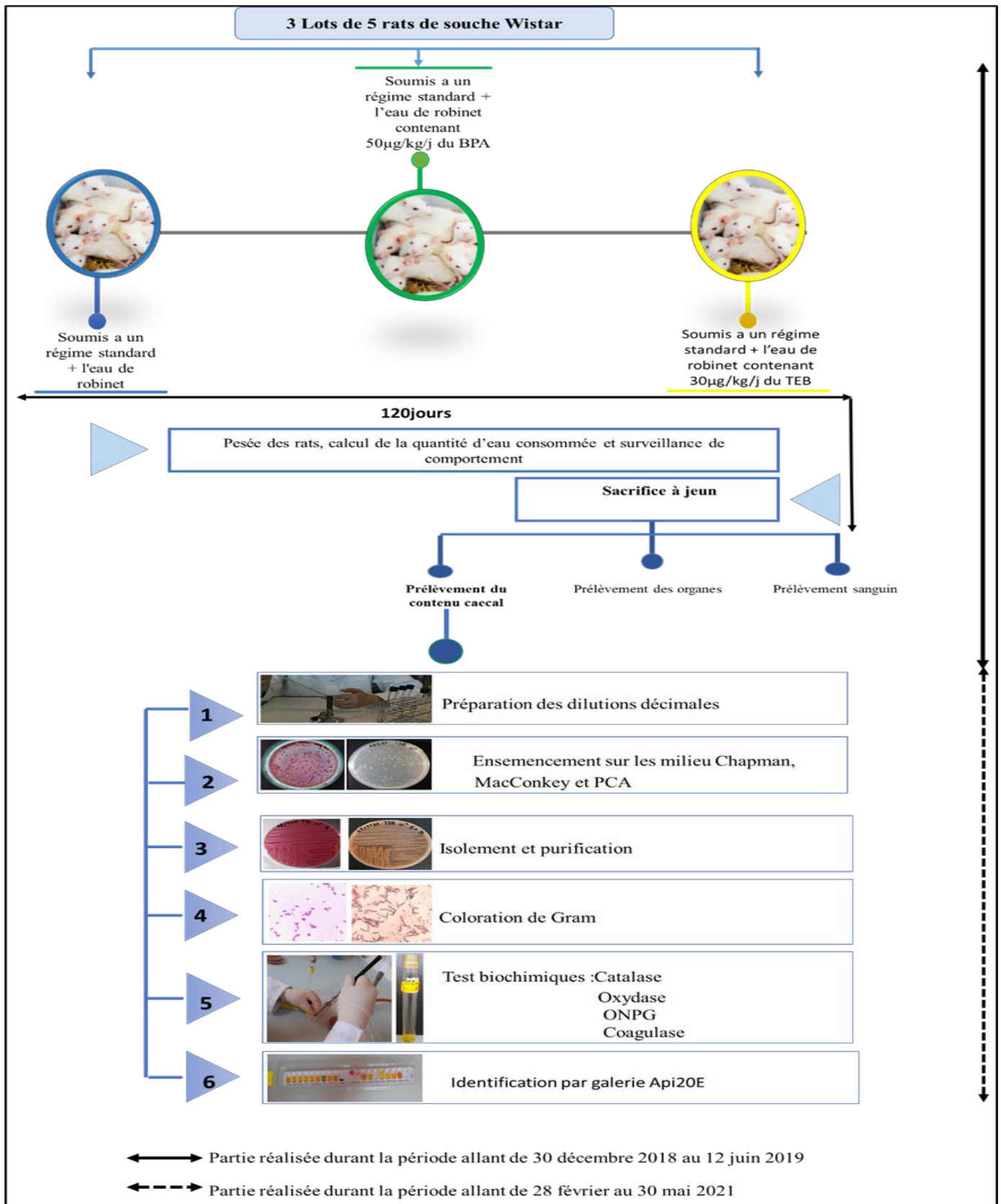


Figure n°04 : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale

II.3.2. Méthodes

II.3.2.1 Etude de l'impact du fongicide (tébuconazole) sur la composition de la flore intestinal

Pour étudier l'effet toxique du tébuconazole, via la modulation de la flore intestinal, nous avons recherchés quelques espèces bactériennes impliquées dans l'altération de la composition et de l'abondance des populations bactériennes intestinales, Pour se faire. Nous avons procédé à la démarche suivante :

Après récupération des échantillons (préparés préalablement en utilisant 1g de contenu caecal dans 9ml d'eau physiologique et conservés à - 20 °C), Les principales bactéries de la flore intestinale suivantes ont été recherchées dans le contenu caecal : FMAT (la flore aérobies mésophile totale), *Entérobactéries* et *Staphylocoques*

II.3.2.1. Dénombrement des bactéries dans les échantillons de matière caecale

II.3.2.1.1 Flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La flore aérobie mésophile totale représente l'ensemble des microorganismes se développant en présence d'oxygène à une température optimale de 30°C (multiplication active de 10°C à 45°C). (Attemene, 2014).

Le milieu utilisé pour le dénombrement des FMAT est la gélose PCA. L'ensemencement a été fait par incorporation dans la masse de la gélose. Un volume de 1 ml a été prélevé à partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-12} dans l'eau physiologique, puis déposé dans une boîte de Petri. Ensuite, le milieu préalablement fondu puis refroidie est coulé dans la boîte contenant l'inoculum. L'homogénéisation est faite en effectuant des mouvements circulaires en formes de «8». L'incubation se fait à 37°C pendant 24h à 72h.

II.3.2.1.2 *Entérobactéries*

Les *Entérobactéries* sont des bacilles à Gram négatif constituant un ensemble important de bactéries et comportant de nombreux pathogènes (Tortora et al., 2003). Leur dénombrement a été effectué au niveau du contenu caecale sur un milieu sélectif : Le milieu MacConkey permet l'isolement des bactéries à Gram- non exigeantes et la différenciation des colonies lactose+ et lactose-(Chouder et al., 2006).

L'ensemencement se fait en surface à partir des dilutions décimales préparées précédemment. Une prise d'essai de 0.1 ml a été prélevée de l'échantillon à analyser et déposée à la surface du milieu de culture en boîte de Petri. Ensuite, elle a été étalée soigneusement sur la surface de la gélose. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

II.3.2.1.3 Dénombrement des Staphylocoques

Les *Staphylocoques* sont des bactéries sphériques à Gram positif qui s'assemblent en grappe de forme irrégulière (Tortora et al., 2003). Leur dénombrement se fait en surface sur le milieu Chapman qui donne une indication de l'action de la souche isolée sur le mannitol, l'utilisation du mannitol avec production d'acide se traduit par un virage de couleur du rouge vers le jaune (Guiraud, 2003).

II.3.2.2. Isolement des microorganismes

Après incubation on sélectionne les boîtes présentant des colonies microbiennes. La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies: la couleur, la forme, le diamètre, l'aspect, l'opacité...

Les colonies obtenues sont prélevées et ensuite purifiées par repiquages successifs sur les différents milieux par la méthode de stries jusqu'à obtention de cultures pures.

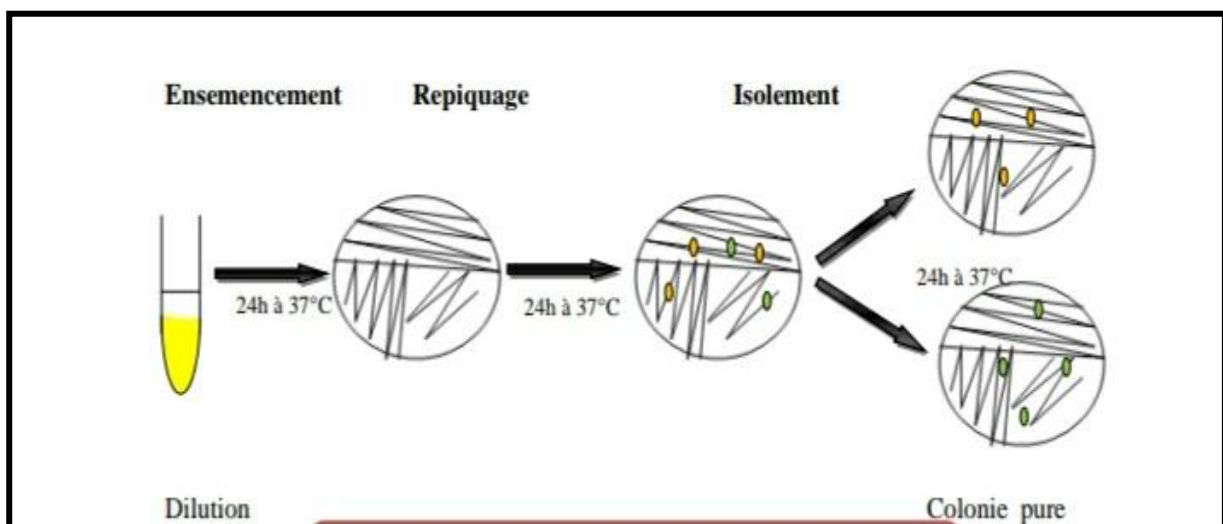


Figure n°05 : Isolement et purification des bactéries (Benharzallah et al., 2014)

II.3.2.3. Tests d'identification des bactéries recherchées

II.3.2.3.1 Critères morphologiques

L'étude morphologique a été basée sur l'observation macroscopique des colonies qui permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (**Guezlane et al., 2010**) et l'examen microscopique qui permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes par la coloration de Gram. (**Meriah et Nabi, 2017**).

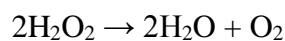
II.3.2.3.2 Caractères biochimiques

Les bactéries ont été identifiées par l'étude des caractères biochimiques. En effet, ces dernières sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions biochimiques qui se traduisent par la production d'enzymes (catalase) et par le type nutritionnel (fermentation ou oxydation des sucres, production ou pas de gaz,,,))

II.3.2.3 .2.1 Test de Catalase

- Principe

La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) issue de la voie respiratoire oxydative directe en eau et en oxygène libre qui se dégage sous forme gazeuse. (**Marchal et Bourdon, 1973**)



-Technique

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H₂O₂ à 10 volumes (**Levy et al., 1992**).

-Lecture

Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène

II.3.2.3 .2.2 Test d'Oxydase

Principe

Le test de l'oxydase est basé sur une éventuelle production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C (**Kovacs et al., 1995**).

Technique

Pour déterminer l'activité oxydase, une colonie prélevée est mise sur le réactif oxydase (disque imprégné).

Lecture

Le développement d'une couleur violette signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme oxydase (**Kovacs et al., 1995**).

II.3.2.3 .2.3 Test d'ONPG (orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside)

Principe

L'ONPG est un analogue structural du lactose. Ce substrat synthétique incolore peut être scindé en galactose et en orthonitrophénol (composé soluble jaune) en présence d'une des enzymes appelées ONPG-hydrolase (**Delarras, 2007**).

Technique

La recherche de la beta galactosidase consiste à

- Réaliser une suspension bactérienne dense dans 0,5 ml d'eau stérile.
- Introduire un disque de papier imprégné du substrat ONPG de manière aseptique.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures

Lecture

Une réaction ONPG positive se traduit par l'apparition d'une couleur jaune.

II.3.2.3 .2.4 Test de Coagulase

Principe

La coagulase se lie avec la prothrombine pour former la staphylothrombine qui entraîne la polymérisation du fibrinogène dans le plasma pour former le caillot de fibrine (**Rasamiravaka et al., 2015**).

Technique

Le test se fait par l'addition de plasma à la culture bactérienne. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

La formation d'un coagulum indique la présence d'une coagulase.

II.3.2.4 Identification par la galerie Api 20E

- Standardisation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, il faut prélever une colonie sur gélose et la mettre en suspension dans l'eau physiologique stérile. Cette suspension est ensuite ajustée à une densité égale à celle de l'étalon 0,5 de l'échelle de Mc Farland par comparaison visuelle sur un fond blanc à bandes noires. Ensuite la lecture de la densité optique (DO) se fait sur un spectrophotomètre. L'inoculum contient, en général, 1 à 3 x 10⁸ bactéries par ml (Nguyen, 2000)

- Technique

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une micropipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes), poser la pointe de la micropipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation, vers l'avant
- pour les tests CIT, VP, et GEL remplir tube et cupule.
- pour les autres tests remplir uniquement les tubes (non les cupules).
- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.
- refermer la boîte d'incubation
- incuber à 37°C pendant 24 h. (Metleff, 2007)

Lecture

Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Annexe n°6).

Chapitre III :
RÉSULTATS & DISCUSSION

Résultats et discussions

III .1. Dénombrement des bactéries dans les échantillons de la matière caecale

Cette étude s'intéresse à une exposition chronique d'un modèle murin à deux polluants (le Tébuconazole et le Bisphénol A. Les doses des polluants sont ajustées de sorte à ce que l'exposition soit de l'ordre de la Dose Journalière Tolérable (DJA), supposée sans effet chez l'homme, pour chacun des 2 polluants.

III .1.1 Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

Après incubation des boîtes de Petri et dénombrement des colonies formées, les résultats obtenus dévoilent qu'une exposition pendant 16 Semaines au Tebuconazole (TEB) et au Bisphénol A (BPA) altèrent le microbiote intestinal des rats femelles . En effet, les résultats (**Figure n°06**) révèlent une diminution de la Flore aérobie mésophile totale dans le contenu caecal des rats exposés au BPA par rapport au groupe témoin (**12.56 log₁₀ UFC/g vs 13.27 log₁₀ UFC/g**) avec un pourcentage de diminution évaluée à **5.35%**. Aussi une diminution évaluée à **7,97 %** de la FAMT dans le contenu caecal des rats exposés au TEB a été constatée par rapport au groupe témoin, on note **12.29 log₁₀UFC/g vs 13.27 log₁₀ UFC/g**. les résultats montrent une diminution de la FAMT dans le contenu caecal des rats exposés au TEB par rapport à ceux exposés au BPA avec un taux diminution de **2.19%**.

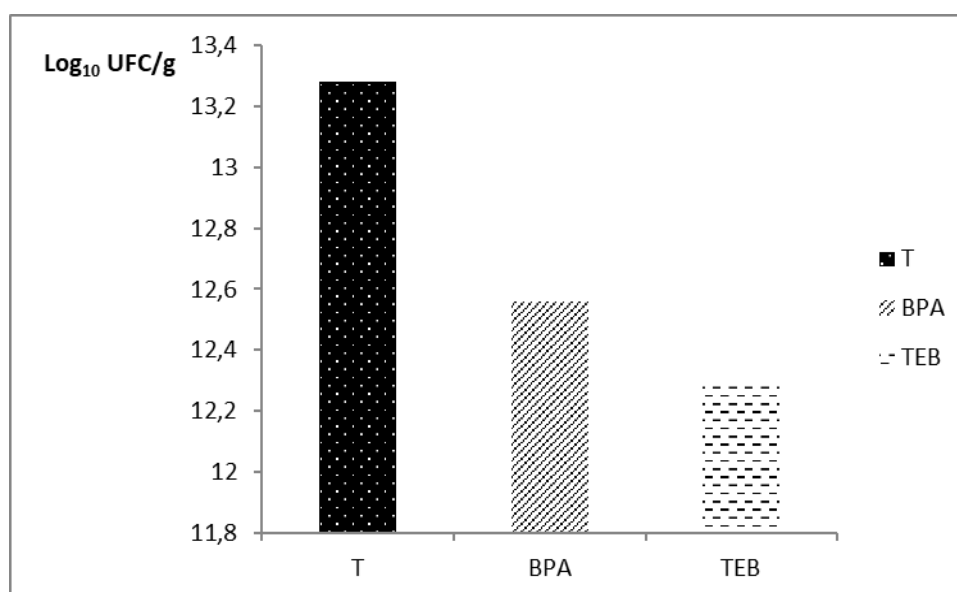


Figure n°06 : Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale chez les rats exposés au TEB et au BPA durant les 16 semaines de traitement.

III .1.2 Dénombrement des *Entérobactéries*

Le résultat obtenu suite au dénombrement des *Entérobactéries* dans le contenu caecal des rats exposés au BPA augmentent par rapport au témoin **5.53 log₁₀ UFC/g** vs **4.39 log₁₀ UFC/g**, avec un pourcentage d'augmentation de **25.96%**. Ainsi qu'une augmentation de **208.2%** des *Entérobactéries* a été observé chez le groupe des rats exposés au TEB par rapport au témoin.

Nos résultats indiquent aussi une augmentation de **144.66%** des *Entérobactéries* des rats exposés au TEB comparativement avec ceux exposés au BPA

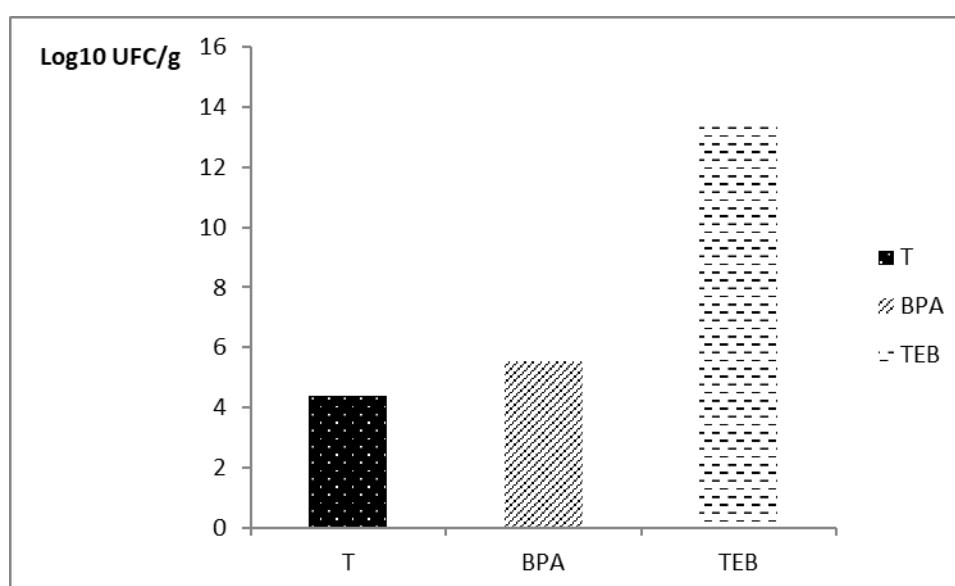


Figure n°07 : Dénombrement des *Entérobactéries* chez les rats

Exposés aux TEB et au BPA durant les 16 semaines de traitement.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne

III.1.3 Dénombrement des staphylocoques

On a enregistré une augmentation de **23.29%** des *Staphylocoques* chez le groupe des rats exposés au BPA par rapport au témoin (**5.77 log₁₀ UFC/g** vs **4.68 log₁₀ UFC/g**). Le nombre des *Staphylocoques* calculés dans le groupe des rats qui recevaient l'eau de robinet avec le TEB (**7.21 log₁₀ UFC/g**) est supérieur à celui des groupes témoins avec une augmentation de **54%**. Il va de même pour les rats exposés au TEB et au BPA avec un taux d'évolution de **24.95%**.

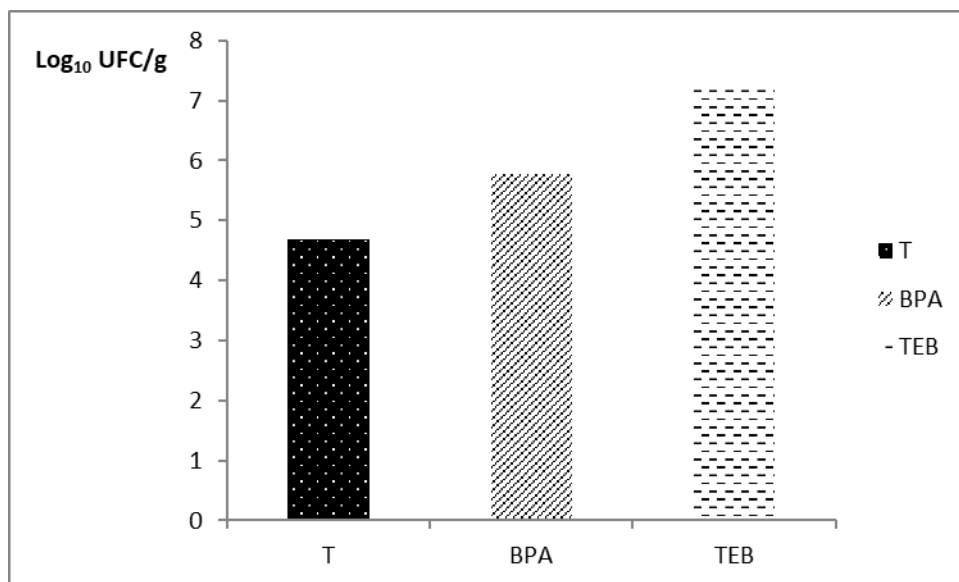


Figure n°08 : Dénombrement des *Staphylocoques* chez les rats exposés aux TEB et au BPA durant les 16 semaines de traitement.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes

III.2 Identification des bactéries isolées à partir des échantillons de matière caecale

III.2.1 Identification des *Entérobactéries*

Les résultats concernant les caractères morphologiques des *Entérobactéries* isolées à partir des échantillons de matière caecale figurent dans le tableau suivant.

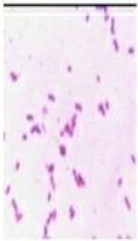





Échantillon Test	Témoin		TEB		BPA	
	Macroscopique	Aspect muqueux, colonies de couleur rose	Colonies irrégulières, incolores.	Aspect muqueux, colonies de couleur rose	Colonies bombées et muqueuses	Aspect muqueux, colonies de couleur rose
Microscopique	Gram négatif Coccobacille	Gram négatif Bacille	Gram négatif Coccobacille	Gram négatif Bacille	Gram négatif Coccobacille	Gram négatif Bacille
						

Tableau n°02 : Critères morphologiques des *Entérobactéries* isolés du contenu caecal

Les résultats concernant les caractères biochimiques des *Entérobactéries* isolées à partir des échantillons de matière caecale figurent dans le tableau suivant

Tableau n°03 : Caractères biochimiques des *Entérobactéries* isolés du contenu caecal

Échantillon Tests	Témoin		TEB		BPA	
	Catalase	+	+	+	+	+
Oxydase	-	+	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	-	+	-
LDC	-	-	-	+	-	+
ODC	+	-	+	-	+	-
CIT	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	+	-	+
TDA	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-
VP	+	-	+	+	+	+
GEL	-	+	-	-	-	-
GLU	+	-	+	+	+	+
MAN	+	-	+	+	+	+
INO	-	-	-	+	-	+
SOR	+	-	+	+	+	+
RHA	+	-	+	+	+	+
SAC	+	-	+	+	+	+
Identification	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Les bactéries isolées à partir du contenu caecal des rats du groupe témoin sont principalement *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* (bacille gram négatif non entérobactéries). Alors que les bactéries *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées à partir des échantillons de rats exposés au TEB et BPA. (Tableau n°03).

Les résultats obtenus sont reportés dans le (**Tableau n°03**). Ils indiquent que l'espèce *Enterobacter cloacae* possède les enzymes β -galactosidase (ONPG), Ornithine décarboxylase (ODC), la catalase, mais elle est dépourvue de l'Uréease (URE), Lysine décarboxylase (LDC), la bactérie ne produit pas le H₂S, elle utilise le Citrate (CIT) comme source de carbone et d'énergie.

Les résultats obtenus (**Tableau n°03**) montrent aussi que *Pseudomonas aeruginosa* possède les enzymes β -galactosidase (ONPG), mais elle est dépourvue de l'Uréease (URE), Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), Tryptophane désaminase et Thiosulfate réductase, ainsi cette espèce utilise Citrate (CIT) comme unique source de carbone et d'énergie.

Nos résultats (**Tableau n°03**) révèlent que *Klebsiella pneumoniae* possède les enzymes β -galactosidase (ONPG), Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), mais elle est dépourvue de l'Uréease (URE), Tryptophane désaminase et Thiosulfate réductase, ainsi cette espèce utilise Citrate (CIT) comme source de carbone et d'énergie et elle utilise glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), dans son métabolisme







Le traitement de ces résultats a été réalisé à l'aide d'un logiciel d'identification "apiweb" (<http://apiweb.biomerieux.com>).

III.2.2 Identification des staphylocoques

L'identification des *Staphylococcus sp* dans le contenu caecal des rats Témoins et les groupes exposés aux polluants

On remarque la présence des *Bacillus sp* dans les Témoins et dans les groupes exposés aux polluants

Tableau n °04 : Caractères morphologiques et biochimiques des *staphylocoques* et *Bacillus* isolés du contenu caecal

Échantillon Test	Témoin		TEB		BPA	
	Macroscopique	Colonie jaune, arrondies à bords régulier	Colonie blanche, arrondies à bords régulier	Colonie jaune, arrondies à bords régulier	Colonie blanche, arrondies à bords régulier	Colonie jaune, arrondies à bords régulier
Microscopique	Gram positif Coques associés en grappe de raisin 	Bacille Gram positif 	Gram positif Coques associés en grappe de raisin 	Bacille Gram positif 	Gram positif Coques associés en grappe de raisin 	Bacille Gram positif 
Catalase	+	-	+	-	+	-
Coagulase	-	-	-	-	-	-
Identification	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>

Discussion

Les preuves actuelles indiquent que la composition des microbiotes intestinaux joue un rôle important dans le maintien de la santé animale et les déséquilibres communautaires peuvent prédisposer à certaines maladies (**Horai et al., 2015 ; Sun et Chang, 2014**). L'alimentation, un des facteurs clés qui modulent l'écologie intestinale humaine, est connu pour être associé avec différentes maladies métaboliques (**Chiu et al., 2015 ; Ma et al., 2015 ; Ojeda et al., 2015**). Pour élucider l'influence de l'alimentation plusieurs études ont examiné si l'absorption des contaminants chimiques exerce un effet sur le microbiote intestinal.

Au cours de cette présente étude et suite au traitement des rats aux polluants une réduction du nombre de la flore aérobie mésophile totale a été constatée chez les rats exposés au TEB et au BPA par rapport au groupe des témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Fazeli** et ses collaborateurs (**2014**). En effet, ils dévoilent que le cadmium (polluant environnemental) réduit la croissance de la flore aérobie mésophile totale au niveau du rectum.

Dans notre étude on a constaté une augmentation des *Entérobactéries* (*protéobactéries*) chez les rats exposés au TEB et au BPA par rapport aux rats témoins. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par **Liu** et ses collaborateurs (**2021**) ou ils ont démontré que les rats exposés au TEB ont un nombre élevé des *Entérobactéries* et les LPS produits par ces *Entérobactéries* ont été signalé comme étant environ 1000 fois plus élevé que ceux d'autres bactéries. Selon les investigations faites par **Fabbiano** et ses collaborateurs (**2018**) et **Fang** et ses collaborateurs (**2019**) expliquent que Le LPS est un composant majeur de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives et il est largement considéré comme la principale endotoxine entraînant une inflammation en activant le gène de réponse inflammatoire, par conséquent l'inflammation endommageait la barrière intestinale et accélérât la fuite de LPS de l'intestin vers le sang. La diminution de la barrière intestinale augmente à son tour l'inflammation.

Nos résultats correspondent aussi aux résultats obtenus par **Jiang** et ses collaborateurs (**2020**) ils ont exposés des rats à une dose de **0.4 mg/l** de difenoconazole (Fongicide) ils ont remarqué une augmentation des *Entérobactéries*. Selon l'étude de **Wang** et ses collaborateurs (**2020**) sur la toxicité des fongicides ont trouvé que le fongicide altère la fonction de la barrière intestinale liée au métabolisme des glucolipides. Et l'analyse a montré aussi des endommagements au niveau du foie. De plus le microbiote intestinal était significativement affecté avec des augmentations des pathobiontes.

Les résultats obtenus par **Réquilé** et ses associés (2018) sont en concordance avec nos résultats, lors de l'exposition de chlorpyrifos (pesticide) ont trouvés une augmentation des *Entérobactéries* du tube digestif.

Aussi les résultats trouvés par **Xu** et ses collaborateurs (2014) sont similaires à nos résultats, leur étude a consisté d'étudier l'effet d'epoxiconazole (fongicide) sur le microbiote intestinal puis ils ont trouvé que ce fongicide a induit une dysbiose du microbiote intestinal en augmentant le nombre des *Entérobactéries* et ils ont indiqué que cette augmentation est liée à inflammation intestinal.

Aussi les résultats obtenus indiquent une réduction du nombre des *Staphylocoques* et *Bacillus* (Firmicute) de la matière caecale des rats exposés au deux polluants, ces résultats correspondent aux résultats trouvés par **Joly Condette** et ses collaborateurs (2015) ils ont étudié l'effet de chlorpyrifos (pesticide) sur le microbiote et les résultats ont été comme suit une augmentation significative des *Staphylocoques*, ce qui explique que le pesticide a provoqué une dysbiose qui a pu faciliter la colonisation de l'intestin par différents pathobiontes capables d'aggraver l'inflammation intestinale (**Rahmouni et al., 2016**).

Nos résultats sont aussi conformes à ceux obtenus par **Charron (2016)**, il a exposé les rats au chlorpyrifos puis il a constaté que le nombre des *Staphylocoques* a augmenté.

D'après les études de **Claus** et ses collaborateurs (2016) dans le cadre de l'explication du mécanisme d'action des polluants sur le microbiote intestinal ils ont pu démontrer que les produits chimiques de l'environnement qui sont mal absorbés après ingestion se retrouvent dans l'intestin grêle et le caecum par péristaltisme, et ceux qui se répartissent à travers la paroi intestinale directement à partir du sang peuvent être métabolisés par le microbiote gastro-intestinal. La plupart des xénobiotiques sont non polaires et donc facilement absorbés par le tractus gastro-intestinal, puis transportés par le sang vers le foie pour la détoxification. Le foie a tendance à oxyder les xénobiotiques, formant des conjugués avec l'acide glucuronique, le sulfate ou le glutathion qui peuvent être excrétés dans la bile et pénétrer dans l'intestin où le métabolisme du microbiote peut avoir lieu. Le microbiote gastro-intestinal se déconjugue et réduit généralement les métabolites hépatiques xénobiotiques, entraînant la formation de molécules non polaires de poids moléculaire inférieur, qui sont facilement réabsorbées. La déconjugaison médiée par le microbiote des métabolites précédemment conjugués par le foie peut régénérer le xénobiotique d'origine ou former de nouveaux métabolites toxiques.

Pour les résultats de l'identification des *Entérobactéries* et les bacilles Gram négatif on a constaté une présence de *Klebsiella pneumoniae* chez les rats exposés au TEB et au BPA, ces bactéries pathogènes sont retrouvées avec un nombre élevé.

L'étude réalisé par **Zhiyuan** et ses collaborateurs (2020) sur l'aldicarbe (substance chimique) a montré que l'aldicarbe interférait avec la trajectoire du développement du microbiote intestinal augmente de la pathogénicité des bactéries intestinales.

Par ailleurs **Liu** et ses collaborateurs (2021) ont étudié l'effet de tébuconazole sur le microbiote intestinal. Ils ont constaté que le TEB a entraîné des déséquilibres du microbiote, et ils ont observé que *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Romboutsia*, *Mitsuokella*, *Enterococcus*, et *Sphingomonas* ont été augmenté par l'effet du tébuconazole, tandis que *Alloprevotella*, *Bacteroides*, et *Muribaculum* ont été diminués. Ce qui explique que L'écologie intestinale a été détériorée en raison de l'accumulation de bactéries pathogènes majeures. Par exemple, l'accumulation de L'entérocoque entraîne une inflammation intestinale et abaisse la flore productrice butyrate dans l'intestin. *Klebsiella* et *Streptococcus* sont également des bactéries infectieuses typiques.

Aussi une autre étude de **Lai** et ses collaborateurs (2016) a montré que l'exposition des animaux au BPA augmente le nombre de la famille des *Helicobacteraceae* qui est positivement associée à une maladie inflammatoire de l'intestin En fait, les patients atteints de MCI conservent significativement de plus grandes quantités d'*Helicobacteraceae* que les individus sains , Notamment, il était clairement démontré que la présence d'*Helicobacteraceae* dans le tractus gastro-intestinal a déclenché l'immunité de l'hôte pour attaquer les micro-organismes intestinaux normaux.

CONCLUSION

Ces dernières années l'étude du microbiote intestinal et de son incidence sur la santé humaine est devenue un domaine de recherche majeur. Cette vaste communauté microbienne, hébergée dans l'intestin, exerce de nombreuses fonctions biologiques et métaboliques et confère de nombreux avantages à l'hôte. Plusieurs travaux, indiquent que le microbiote intestinal, interagit avec les polluants environnementaux. Cette interaction peut avoir des conséquences toxicologiques importantes via la modification des fonctions du microbiote intestinal. Des études épidémiologiques suggèrent un lien très étroit entre l'exposition à ces polluants et l'incidence des maladies métaboliques comme le diabète de type 2, la stéatose hépatique, et l'obésité.

L'objectif de cette présente étude consiste à étudier l'impact de l'exposition chronique, orale des jeunes rats femelles au Tébuconazole et au Bisphénol A comme facteurs environnementaux pouvant induire une dysbiose du microbiote intestinal.

Nos résultats indiquent un effet délétère des polluants utilisés au cours de cette étude sur la composition du microbiote intestinal des rats femelles exposés au BPA et au TEB, et ce malgré leur utilisation à des faibles doses sensées être sans effet nuisible. Ceci est reflété par une diminution de la flore aérobie mésophile totale chez les rats exposés aux polluants. La réduction de cette flore intestinale chez les rats exposés au BPA était à un moindre degré que ceux exposés au TEB.

Les résultats obtenus indiquent aussi une augmentation des *Entérobactéries*, *Staphylocoques* et *Bacillus* du contenu caecal des rats exposés au TEB et BPA par rapport au groupe des rats témoins.

Ce travail s'est particulièrement intéressé à l'étude d'impact des polluants sur la diversité du microbiote intestinal. Les résultats obtenus après 16 semaines du traitement, révèlent que le BPA et TEB influencent la diversité du microbiote intestinal. En identifiant les bactéries on a trouvé présence *Enterobacter cloacae* et *pseudomonas aeruginosa* dans le contenu caecal des rats témoins. Par contre pour l'identification des rats exposés au TEB et au BPA on a trouvé présence d'*Enterobacter cloacae* et *Klebsiella pneumoniae*.

L'ensemble de ces résultats sont suffisamment convaincants pour remettre en cause l'utilisation excessive des polluants environnementaux de manière générale et les pesticides en particulier et envisager un développement d'outils permettant de prédire l'effet potentiellement délétère de ces polluants environnementaux sur la santé et l'environnement.

Cependant, il est clair que des tests supplémentaires et des investigations plus profondes sont nécessaires à entreprendre afin de consolider ces résultats. Ainsi dans la continuité de ce présent travail plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Il est fort intéressant de :

* Approfondir l'étude sur les interactions des polluants environnementaux avec le microbiote au niveau moléculaire.

* Développer des outils utiles pour une évaluation des risques valide dans les populations exposées pour des raisons environnementales ou professionnelles, et obtenir éventuellement les éléments nécessaires à toute modification des politiques réglementaires et de la valeur limite seuil.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Amiard J.C.**, 2011. Les risques chimiques environnementaux. Lavoisier.
- **Attemene L.**, 2014. Dénombrement des Germes aérobies mésophiles (GAM) des coliformes totaux et des levures et moisissures dans les fèces d'aulacode (*thryonomys swinderianus*) soumis à deux types d'alimentation (fourrage et granulé). Mémoire de Master. Université Nangui Abrogoua. Cote d'Ivoire.
- **Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G.**, 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Gestion des sols*. 279-293.
- **Batsch D.**, 2011. L'impact des pesticides sur la santé humaine. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine. France.
- **Benharzallah H., Bouhoureira S.**, 2014. Effet de trois produits à base de dattes sur quelques germes de la flore intestinale. Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah. Ouargla. Algérie.
- **Campeotto F., waligoradupriet A., Doucet-populaire F., Kalach N., Dupont C., Butel M.**, 2007. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie clinique et biologique*. 31:533-542.
- **Chaneyackfa G.**, 2017. Microbiote intestinal et diabète. Thèse de Doctorat. Université de Poitiers. France.
- **Charron C.**, 2016. Exposition chronique du chlorpyrifos en association à un régime obésogène sur le microbiote intestinal chez le rat. Amiens: Laboratoire PériTox- INERIS.
- **Chevalier J.**, 2018. Microbiote intestinal : de la physiologie à la pathologie: exemple de la maladie de parkinson. Thèse de Doctorat. Université de Lille. France.
- **Chiu, Y.F., Hsu C.C., Chiu T.H., Lee C.Y., Liu T.T., Tsao C.K., Chuang S.C., Hsiung C.A.**, 2015. Cross-sectional and longitudinal comparisons of metabolic profiles between vegetarian and non-vegetarian subjects: a matched cohort study. *Br. J. Nutr.* 114, 1313e1320.
- **Chouder N.**, 2006. Contribution à l'étude des flores intestinales des poulets conventionnels sains. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Consantine. Algérie.
- **Claus P.S., Guillou H., Ellero-Simato S.**, 2016. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants?. *Biofilms and microbiomes*. 2, 16003.

- **Debré P., Legall J.,** 2014. Le microbiote intestinal. Bulletin de l'académie nationale de médecine. 198(9) : 1667-1684.
- **Debré P., Legall J.,** 2014. Le microbiote intestinal. Bulletin de l'académie nationale de médecine. 198(9) : 1667-1684.
- **Delarras C.,** 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier. France.
- **Dolié E.,** 2018. Rôle de la flore intestinale dans l'immunité : usage actuel des probiotiques et futures indications. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. France.
- **Fabbiano S., Suarez-Zamorano N., Chevalier C., Lazarevic V., Kieser S., Rigo D., Leo S., Veyrat-Durebex C., Gaia N., Maresca M., et al.,** 2018. Functional gut microbiota remodeling contributes to the caloric restriction-induced metabolic improvements. Cell metabolism. 28(6):907.
- **Fang Q., Hu J., Nie Q., Nie S.,** 2019. Effects of polysaccharides on glycometabolism based on gut microbiota alteration. Trends in food science and technology.92:65-70.
- **Fazeli M., Hassanzadeh P., Alaei S.,** 2014. Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. Human and Experimental Toxicology. 30(2) :152-159.
- **Gamet L.,** 2019. Impact des mélanges de pesticides. Innovations agronomiques. (73) : 51-59.
- **Goulet O.,** 2012. Le microbiote intestinal. Réalités pédiatriques.
- **Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., et Athmani-Guemouri S.,** 2010. Microbiologie : travaux pratiques, 2ème édition. Ed. Offices des publications universitaires. Alger.
- **Guiraud J.P.,** 2003. La microbiologie alimentaire. Dunod. France.
- **Horai R., Zarate-Blades C.R., Dillenburg-Pilla P., Chen J., Kielczewski J.L., Silver P.B., Jittayasothorn Y., Chan C.C., Yamane H., Honda K., Caspi R.R.,** 2015. Microbiota-Dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site. Immunity 43.
- **Jiang J., Chen L., Wu S., Lv L., Liu X., Wang Q., Zhao X.,** 2020. Effects of difenoconazole on hepatotoxicity lipid metabolism and gut microbiota in zebrafish (Danio rerio). Environ Pollut. 265,114844.
- **Jin Y., Wu S., Zeng Z., Fu Z.,** 2017. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. Environmental pollution. 222 :1-9.
- **Joly Condet C., Bach V., Mayeur C., Gay-Quéheillard J., Khorsi-Cauet H.,** 2015. Chlorpyrifos Exposure during Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota

Associated with Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. *Gastroenterol nutr.* 61, 30–40.

- **Kovacs L.G., Ballati P.A., Kroshman H.B., Pueppke S.G.,** 1995. Transcriptional organisation and expression of nol XWBTUV. A locus that regulates cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *molecular microbiology*. 17 :923-933
- **Lagier J.C., Million M., Hugon P., Armougom F., Raoult D.,** (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2. 136.
- **Lai K., Chung Y., Li R., Wan H., Wong C.,** 2016. Bisphenol A alters gut microbiome: comparative metagenomics analysis. *Environmental Pollution*. 39(8) :1-8
- **Lai K., Chung Y., Li R., Wan H., Wong C.K.,** 2016. Bisphenol A Alters Gut Microbiome: Comparative Metagenomics Analysis. *Environ Pollut.* 218
- **Lallès J.P.,** 2013. Effets à long terme de la nutrition et de l'environnement précoces sur la physiologie Intestinale. *Cahiers de nutrition et de diététique*. 48 : 191-200.
- **Landman C., Quévrain E.,** 2016. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de médecine interne*. 37 :418–423.
- **Levy E., Eyal Z., Chet I., Hochman A.,** 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. p40.
- **Liang Y., Liu D., Zhan J., Luo M., Han J., Wang P., Zhou Z.** 2020. New insight into the mechanism of POP-induced obesity: Evidence from DDE-altered microbiota. *Chemosphere*. 244.125123.
- **Liu J., Zhao F., Xu Y., Qiu J., Qian Y.,** 2021. Gut flora-mediated metabolic health, the risk produced by dietary exposure to acetamiprid and tebuconazole. *Foods*. 10,835.
- **Ma Z.J., Zhang X.N., Li L., Yang W., Wang S.S., Guo X., Sun P., Chen L.M.,** 2015. Tripterygium glycosides tablet ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via the toll-like receptor 4/Nuclear factor kappa B signaling pathway in high-fat diet fed and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Diabetes Res*. 2015, 390428.
- **Magdelaine C.,** (2018). Le bisphénol A, perturbateur endocrinien, est interdit dans les contenants alimentaires, mais jusqu'à quand / notre –planète. Info., <https://www.notre-planete.info/actualites/3589bisphenol-A-interdiction-boites-conserves?>
- **Marchal N. et Bourdon L.,** 1973. Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin. France. 113p.
- **Marchal N., Bourdon L., Bimet F.,** 1988. Le laboratoire de bactériologie médicale. Doin. France.

- **Marchesseau A.**, 2019. Forces et fragilités du microbiote intestinal, dysbioses et prévention des diarrhées associées aux antibiotiques et à *Clostridium difficile* par la prise de probiotiques. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. France.
- **Marchesseau A.**, 2019. Forces et fragilités du microbiote intestinal, dysbioses et prévention des diarrhées associées aux antibiotiques et à *Clostridium difficile* par la prise de probiotiques. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. France.
- **Marteau P.**, 2013. Microbiote intestinal. Gastro –entérologie. 8(2) :20-27.
- **Meriah S., Nabi I.**, 2017. L'incidence des bactéries multi-résistantes " bmr" en reanimation chu tlemcen: interet du portage digestif du 15 octobre 2016 au 28 fevrier 2017. Mémoire de Master. Université Abou bekr belkaïd. Tlemcen. Algérie.
- **Metlef S.**, 2007. Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extremophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Mémoire de Master. Université Hassiba Ben Bouali. Chlef. Algérie.
- **Nguyen N., To M., Carles M., Tripodi A. et Bodin G.** 2000. Etude de 91 souches d'*Escherichia coli* responsables de la maladie de l'œdème du porcelet dans le sud du Viet Nam. Médecine vétérinaire.151.1.23-32.
- **Ojeda P., Bobe A., Dolan K., Leone V., Martinez K.**, 2015. Nutritional modulation of gut microbiota - the impact on metabolic disease pathophysiology. J. Nutr. Biochem.
- **Olives J.P.**, 2013. Microbiote intestinal. Réalités pédiatriques.
- **Poulier G.**,2014. Etude de l'échantillonnage intégratif passif pour l'évaluation réglementaire de la qualité des milieux aquatiques : application à la contamination en pesticides et en éléments trace métalliques des bassins versants du Trec et de l'Auvézère. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. France.
- **Quévrain E., Seksik P.**, 2013. Microbiote intestinal : de la diarrhée post-antibiotiques aux maladies inflammatoires intestinales. Presse médicale. 42: 45–51.
- **Rahmouni O., Dubuquoy L., Desreumaux P., Neut C.**, 2016. Microbiote intestinal et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. médecine/sciences.32 :968-73
- **Rasamiravaka T., Rasoanandrasana S., Olivat Rakoto A., Rasamindrakotroka A.**, 2015.Coagulase-test en tube sur plasma humain pour l'identification de *Staphylococcus aureus* : peut-on l'utiliser en routine. Journal de Biologie Médicale.
- **Réquilé M., González Alvarez D.O., Delanaud S., Rhazi L., BachV., Depeint F., Khorsi-Cauet H.**, 2018. Use of a combination of in vitro models to investigate the impact of chlorpyrifos and inulin on the intestinal microbiota and the permeability of the intestinal mucosa. Environmental science and pollution research. 25: 22529–22540.

- **Sartor R.B.**, (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134: 577-594
- **Simon J.**, 2016. Le microbiote intestinal : un “ organe ” méconnu. Thèse de Doctorat. Université de Renne. France.
- **Sun J., Chang E.B.**, 2014. Exploring gut microbes in human health and disease: pushing the envelope. *Genes Dis.* 1, 132e139.
- **Tortora G., Funke B., Case C., Martin L.**, 2003. Introduction à la microbiologie. Renouveau pédagogique. Canada.
- **Wang Y., Jin C., Wang D., Zhou J., Yang G., Shao K., Wang Q., Jin Y.**, 2020. Effects of chlorothalonil, prochloraz and the combination on intestinal barrier function and glucolipid metabolism in the liver of mice. *Hazard Mater.* 124639.
- **Xu C., Liu Q., Huan F., Qu J., Liu W., Gu A., et al.**, 2014. Changes in gut microbiota may be early signs of liver toxicity induced by epoxiconazole in rats. *Chemotherapy* 60 : 135-142.
- **Youness M.**, 2013. Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. Thèse de Doctorat. Université Blaise pascal. France.
- **Zhiyuan M., Li L., Sen Y., Wei S., Ming J., Sinuo T., Shiran H., Zhiqiang Z., Wentao Z.**, 2020. Gut microbiota: a key factor in the host health effects induced by pesticide exposure. *Agricultural and Food Chemistry.*

ANNEXES

Annexe n° 1



Figure n°01: Four Pasteur



Figure n°02 : Incubateur



Figure n°03 : L'autoclave

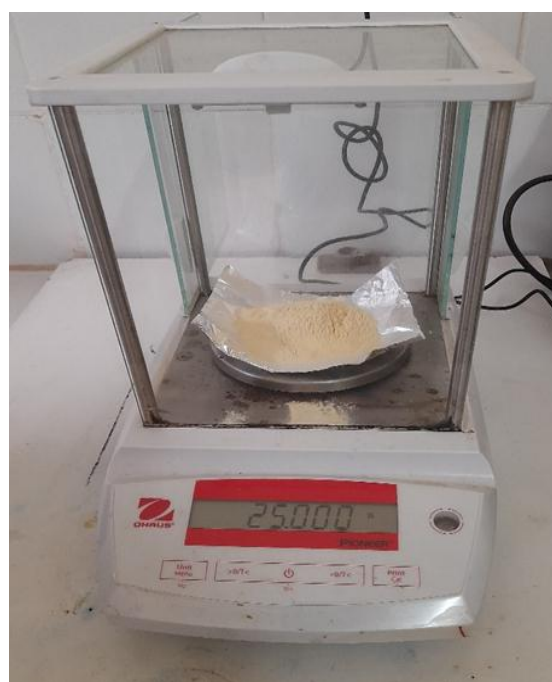


Figure n°04 : la Balance électronique

Annexes n°2



Figure n°05 : Agitateur magnétique

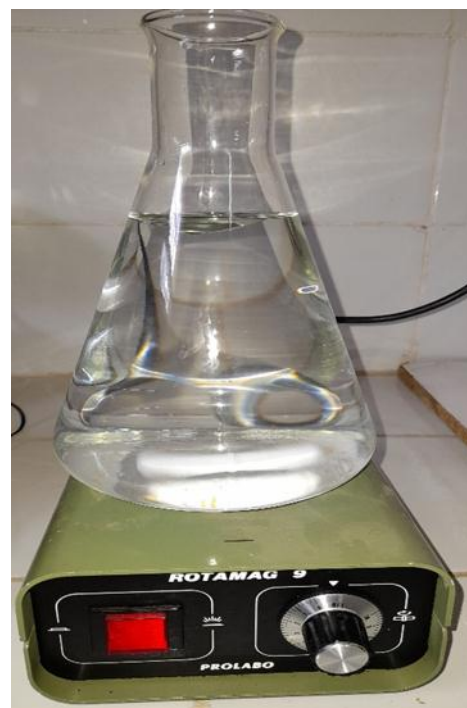


Figure n°06 : Agitateur



Figure n°07 : le vortex



Figure n°08 : le spectrophotomètre

Annexes n°3



Figure n°09 : Test oxydase

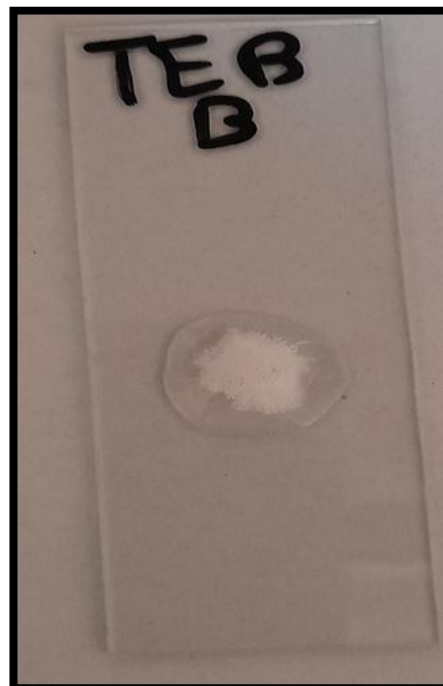


Figure n°10: Test catalase

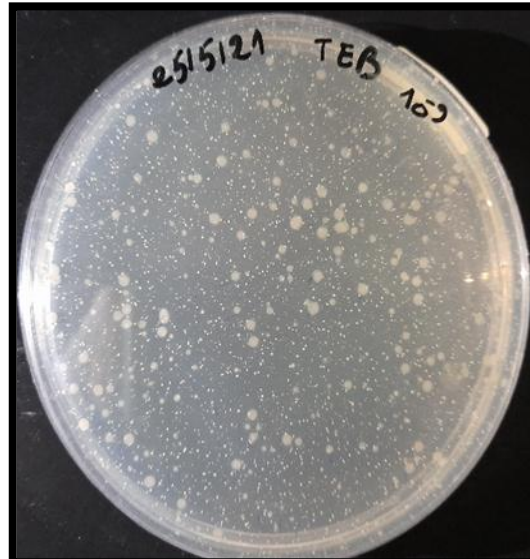
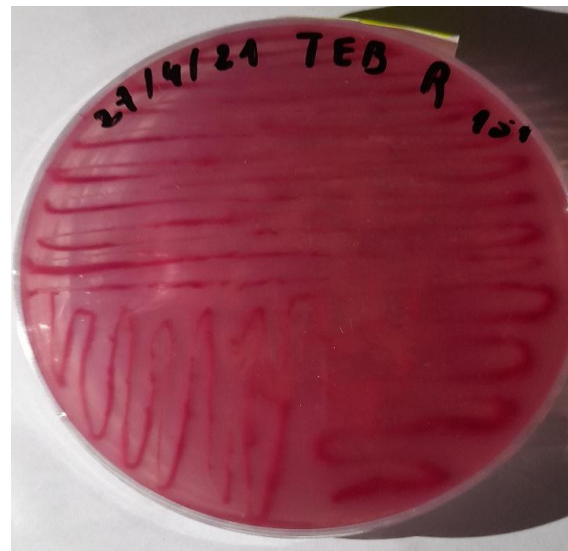


Figure n°11 : Aspect des colonies de la flore aérobie mésophile totale sur le milieu PCA

Annexes n°4



(a)

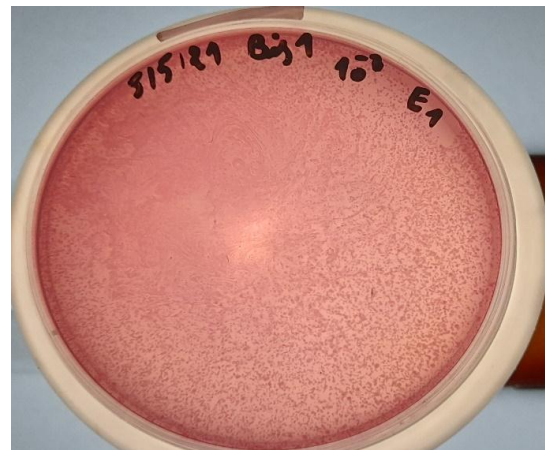


(b)

Figure n°12 : purification des Entérobactéries sur le milieu MacConkey



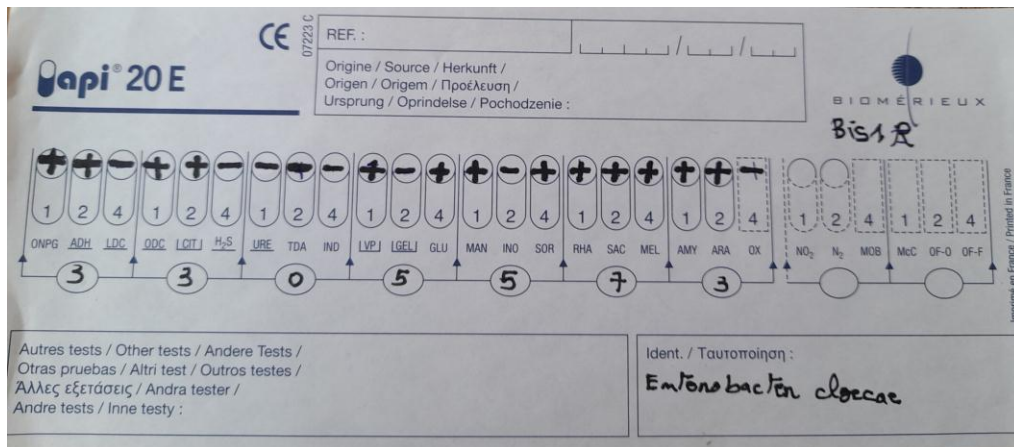
(a)



(b)

Figure n°13 : Aspect des colonies des entérobactéries sur le milieu MacConkey

Annexes n°5



(a)

























(b)

Figure n°14 : L'identification d'*Enterobacter cloacae* par Galerie API 20E

Annexes n°6

Tableau n°01 : Tableau de lecture de la Galerie API 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'o-naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Annexes n°7

Le Bisphénol A

Le Bisphénol A (BPA) est un composé utilisé dans la fabrication de plastique de type polycarbonate ou dans la composition de résines époxy tapissant l'intérieur des conserves alimentaires et canettes. Il est capable de migrer de l'emballage vers l'aliment. Plusieurs études au niveau international ont mis en évidence certaines propriétés dangereuses de cette substance sur la santé, qui a un effet reprotoxique, cancérigène et spécialement un effet sur le système endocrinien et perturbe la balance énergétique (obésogène) chez les rongeurs. **(Ivry-Del Moral et al., 2011)**

En 2011, l'Agence de sécurité sanitaire de l'alimentation (Anses) a notamment publié deux rapports : l'un relatif aux effets sanitaires du bisphénol A, l'autre à ses usages. Ce travail avait mis en évidence des effets sanitaires, avérés chez l'animal et suspectés chez l'homme, même à de faible niveau d'exposition. Depuis le 1er janvier 2015, l'interdiction du BPA a été généralisée aux conditionnements directement en contact avec les denrées alimentaires : canettes, boîtes de conserve et couvercles métalliques **(Magdalaine, 2018)**.

Coloration de Gram

- Préparer un frottis fixé : déposer une goutte d'eau stérile sur une lame puis ajouter à l'anse de platine stérilisée une colonie isolée. Etaler et fixer à la flamme jusqu'à obtenir une lame sèche.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute. Rejeter le colorant et rincer à l'eau distillée.
- Mordançage au Lugo : recouvrir la lame de Lugo et laisser agir pendant 1 minute. Rincer à l'eau distillée.
- Décoloration : recouvrir la lame d'éthanol et laisser agir 30 secondes. Rincer rapidement à l'eau distillée.
- Recoloration : recouvrir la lame de safranine et laisser agir pendant 1 minute. Rejeter le colorant et rincer légèrement à l'eau distillée. Sécher délicatement la lame avec du papier.
- Observation au microscope. Ajouter une goutte d'huile à immersion sur la lame pour l'observation à l'objectif 100.

Annexes n°8

Composition Du milieu Mac Conkey

- Peptone de caséine 7g
- Peptone de viande 3g
- Lactose 10g
- Mélange de sels biliaires 1.5g
- Chlorure de sodium 5.0
- Rouge neutre 0.03g
- Cristal violet 0.001g
- Agar agar 13.5g

Composition du milieu chapman

- Peptone 10,0 g
- Extrait de viande de bœuf 1,0 g
- Chlorure de sodium 75,0 g
- Mannitol 10,0 g
- Rouge de phénol 0,025 g
- Agar 15,0 g
- pH = 7,5
- Eau distillée

Composition du milieu PCA

- Peptone de caséine 5,00 g
- Extrait de levure 2,50 g
- Glucose 1,00 g
- Agar 15,00 g
- pH =7,0
- Eau distillée

Résumé

Les polluants environnementaux sont devenus un danger de plus en plus fréquent pour la santé humaine, Récemment un certain nombre d'études ont démontré que les Polluants environnementaux peuvent entrer d'une manière non ciblée à l'organisme et provoquer des risques potentiels pour la santé et notamment pour le microbiote intestinal. Dans ce contexte, l'objectif de cette présente étude consiste à évaluer l'effet d'un fongicide sur le microbiote intestinal. Les résultats obtenus après 16 semaines de l'exposition des rats femelles au fongicide tébuconazole et au Bisphénol A indiquent une diminution de la flore aérobie mésophile totale dans le contenu caecal des rats exposés au BPA et TEB par rapport au groupe des témoins, les taux de diminution sont respectivement (5.35%, 7.97%). Ces résultats indiquent aussi que la FAMT du contenu caecal des rats exposés au TEB a diminué par rapport à ceux exposé au BPA avec un taux de diminution de 2.19%.

Le résultat obtenu suite au dénombrement des entérobactéries dans le contenu caecal des rats exposés au BPA par rapport au témoin est avec un pourcentage d'augmentation de 25.96%. Ainsi qu'une augmentation de 208.2% des *Entérobactéries* a été observé chez le groupe des rats exposés au TEB par rapport au témoin. Nos résultats indiquent aussi une augmentation de 144.66% des *Entérobactéries* des rats exposés au TEB comparativement avec ceux exposés au BPA.

Les résultats du dénombrement des *Staphylocoques* obtenus révèlent une augmentation de ces derniers dans le contenu caecal des rats exposés au BPA comparativement au groupe témoin avec un pourcentage de 23.9%. Le nombre des *Staphylocoques* calculés dans le groupe des rats qui recevaient l'eau de robinet avec le TEB est supérieure à celui des groupes témoins avec une augmentation de 54%. Aussi les résultats montrent que le nombre des *Staphylocoques* du contenu caecal des rats exposés au TEB augmente d'une façon remarquable par rapport à ceux exposés au BPA avec un taux d'augmentation 24.95%.

Ce travail s'est particulièrement intéressé à l'étude d'impact des polluants sur la diversité du microbiote intestinal. Les résultats obtenus après 16 semaines du traitement, révèlent que le BPA et TEB influencent la diversité du microbiote intestinal. En identifiant les bactéries on a trouvé présence *Enterobacter cloacae* et *pseudomonas aeruginosa* dans le contenu caecal des rats témoins. Par contre pour l'identification des rats exposés au TEB et au BPA on a trouvé présence d'*Enterobacter cloacae* et *Klebsiella pneumoniae*.

Mots clés : Microbiote intestinal murin, Tébuconazole, Bisphénol A, polluants environnementaux.

الملخص .

أظهرت عدة دراسات حديثة أن الملوثات البيئية يمكن أن تدخل الجسم بطريقة غير متعمدة وتتسبب في مخاطر صحية، والهدف من هذه الدراسة. هو تقييم اثر المبيدات الفطريات على الاحياء الدقيقة لا سيما الاحياء الدقيقة المعوية. تشير النتائج التي تم الحصول عليها بعد 16 أسبوعاً من تعرض إناث الجرذان للملوث البيئي Bisphénol A ولمبيد الفطريات Tébuconazole الى انخفاض إجمالي البكتيريا الهوائية المتوسطة في براز الفئران مقارنة بالفئران الشواهد. وكانت مستويات الانخفاض على التوالي. (5.35٪، 7.97٪). هذه النتائج تشير أيضا الى ان عدد البكتيريا الهوائية في براز الفئران التي تعرضت للـ BPA انخفضت بمعدل 2.19٪ مقارنة بتلك التي تعرضت للـ TEB.

النتيجة التي تم الحصول عليها بعد تعداد *Enterobacteriaceae* في محتويات براز الجرذان المعرضة للـ BPA مقارنة مع مجموعة الشواهد كانت بنسبة زيادة قدرها 25.96٪. حيث لوحظت زيادة قدرها 208.2 ٪ في *Enterobacteriaceae* في مجموعة الفئران المعرضة للـ TEB مقارنة بمجموعة الشواهد. تشير نتائجنا أيضا إلى زيادة بنسبة 144.66٪ في البكتيريا المعوية في الفئران المعرضة لمعدل TEB مقارنة بتلك التي تعرضت للـ BPA.

أظهرت نتائج تعداد المكورات العنقودية التي تم الحصول عليها زيادة في محتوى براز الفئران المعرضة للـ BPA مقارنة بمجموعة الشواهد بنسبة 23.9٪. عدد المكورات العنقودية المحسوبة في مجموعة الجرذان التي تلقت ماء الحنفية مع TEB أعلى من تلك الموجودة في مجموعات الشواهد بزيادة قدرها 54٪. كما بينت النتائج أن عدد المكورات العنقودية في براز الجرذان المعرضة لمعدل TEB يزداد بشكل ملحوظ مقارنة بتلك التي تعرضت للـ BPA بمعدل زيادة 24.95٪.

تهتم هذه الدراسة بشكل خاص بدراسة تأثير الملوثات على تنوع الجراثيم المعوية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بعد 16 أسبوعاً من التجريب أن BPA و TEB يؤثران على تنوع الجراثيم المعوية. من خلال تحديد البكتيريا، حيث وجد أن *Enterobacter cloacae* و *pseudomonas aeruginosa* موجودان في براز الجرذان الشواهد من ناحية أخرى قمنا بتحديد البكتيريات الموجودة فب براز الفئران المعرضة للـ TEB و BPA، وجدنا *Enterobacter cloacae* و *Klebsiella pneumoniae*.

الكلمات المفتاحية: المجهرات المعوية للفئران . الملوثات البيئية ,TEB, BPA.