

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun–Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des 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 :

M^{elle} Alaoui Nour El Hoda

M^{elle} Bessad Soumia

M^{elle} Khirani Asma

Thème

**Effet préventif d'une plante médicinale sur les paramètres microbiologiques
chez le rat *Wistar* exposé aux polluants environnementaux**

Soutenu publiquement le 20/07/2022

Jury:

Présidente: Mme BENARABA R.

Encadrante: Mme BOUDALI S .

Co-Encadrante: Mme BENGUIAR R.

Examinatrice: Mme MOULAY M.

Grade

Professeur

MAA

MCA

MCA

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH 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 Mme 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 Mme BENGUIAR 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 MOULAY Meriem et Madame BENARABA Rachida pour avoir accepté de juger et d'examiner notre travail.

Un grand merci à monsieur HEMIDA et madame Fatiha.

Nos gratitude 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

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents pour leurs patiences, leurs soutiens et leurs encouragements

tout en long de ma vie

À mes chers frères Omar, Mohamed Amine, Azzeddine et Mourad

À tous ma famille

À tous mes collègues et mes amies

À mon trinôme d'étude Asma et Soumia

Nour El Hoda

Dédicace

À ma très chère maman

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit.
Ton affection me couvre et ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés
a toujours été ma source de force pour affronter mes différents obstacles.

À mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager .

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection

A mes belles-sœurs Hanane Amra et Fouzia

A mes très chers frères Omar et Mohamed

A ma famille mes proches, et mes amis qui me donnent de l'amour et de la
vivacité (Mokhtaria ,Imen , Amel ,Zohra,Wafa,Najia)et mes collègues Karima,
Marwa , Youcef , Badreddine) sans oublier Brahim qu'il m'as chaleureusement
encouragé et supporté tout au long mon parcours

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur et surtout réussite.

Bessad Soumia

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma mère, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices

A mon père, pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordé

A mes frères : Zakaria et Ilyes

A mes proches et à ceux qui me donnent de l'Amour et de la vivacité

*A ma meilleures amies : Hamida, Yousra, Dhiba, Amel, Zehour, Wissam qui
m'ont toujours encouragé*

A mon trinôme Nour El Hoda et Soumia

*Aux compagnons de route : karima, Marwa, Souhila, Youcef et Badreddine qui
ont partagé les plus beaux moments*

Asma

Liste des abréviations

API :Analytical profile index

ADH :Arginine dihydrolase

Cit :citrate de sodium

DO : densité optique

DJA : Dose journalière admissible

Ex : extrait

Gel : Gélatine

Glu : Glucose

H₂S :sulfure d'hydrogène

IND :Indole

LDC :lysine décarboxylase

ONPG :Ortho-nitrophenyl pyranocite.B-galactosidase

St : standard

TDA : Tryptophane Désaminase

TEB : Tébuconazole

UFC : Unité Formant Colonie

URE :uréase

VP :Voges proskauer

Liste des Tableaux

Tableau N°01	Matériel, réactifs et milieux de cultures utilisés	04
Tableau N°02	Composition du régime expérimentale	06
Tableau N°03	Caractères macroscopique, microscopique des bactéries sur MacConkey isolées de la matière fécale	17
Tableau N°04	Caractères biochimiques des Entérobactéries isolés de la matière fécale	18
Tableau N°05	Caractères macroscopique, microscopique des staphylocoques et <i>Lactobacillus</i> isolés de la matière fécale	20

Liste des Figures

Figure n°01 : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale.....	08
Figure n°02 : Dénombrement des Enterobacteriaceae chez les différents groupes expérimentaux	14
Figure n°03: Dénombrement des <i>Staphylocoques</i> chez les différents groupes expérimentaux	15
Figure n°04: Dénombrement des <i>Lactobacillus</i> chez les groupes expérimentaux durant les semaines de traitement	16

LISTE DES ANNEXES

Annexe N°01	Classification taxonomique de Rosmarinus officinalis et Salvia officinalis.L	
Annexe N°	Composition Des milieux de cultures.....	34
02	Coloration de Gram	35

LISTE DES ABREVIATION	i
LISTE DES TABLEAUX	ii
LISTE DES FIGURES	iii

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	
-------------------	--

CHAPITRE I :MATERIEL & METHODES

Objectifs de l'étude	4
Lieu et durée du travail.....	4
Matériel et produits chimiques.....	4
Matériel végétal	5
Traitement et suivi des animaux	5
Composition du régime expérimental	6
Choix de la dose, de la voie d'administration et de la stratégie d'exposition au tébuconazole	7
Procédure expérimentale.....	9
Préparation des extraits éthanoliques de <i>Rosmarinus Officinalis</i> et <i>Salvia officinalis</i>	9
Etude des effets des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Salvia officinalis</i> sur la composition du microbiote intestinal murin exposé au tébuconazole	9
Dénombrement de quelques bactéries dans la matière fécale	9
Dénombrement des <i>Enterobacteriaceae</i> sur la gélose Mac Conkey	9
Dénombrement des <i>Staphylocoques</i> sur la gélose Chapman	10
Dénombrement des <i>Lactobacillus</i> sur la gélose Man Ragoza Sharpe(MRS) .	10
I.12. Isolement et purification des bactéries obtenues.....	10
I.13. Tests d'identification des bactéries recherchées	10
I.13.1. Caractères morphologiques.....	10
I.13.2. Caractères biochimiques	11
Test de Catalase.....	11
Test d'oxydase.....	11
Identification des <i>Enterobacteriaceae</i> par la galerie Api 20E.....	11

CHAPITRE II :RESULTAS & DISCUSSION

Dénombrement des Entérobactéries	14
--	----

Dénombrement des <i>staphylocoques</i>	15
Dénombrement des <i>Lactobacilles</i>	16
Identification des bactéries isolées à partir des échantillons la matière fécale.....	16
Identification des <i>Entérobactéries</i>	16
Caractèresmorphologiques	16
II.4.1.2. Identification biochimique.....	17
II.4.2. Pré-identification des <i>staphylocoques et lactobacillus</i>	19
Conclusion.....	24
Références bibliographiques	29
Résumé	42

Introduction

Introduction

Le microbiote intestinal humain est composé de 10^{14} bactéries ainsi que d'autres micro-organismes comme les virus, les champignons et les archées. L'étude du microbiote intestinal a dévoilé le rôle fondamental qu'il joue dans la physiologie intestinale mais aussi dans la santé humaine de façon plus générale, comme un véritable « organe caché ». Après la colonisation bactérienne du tube digestif chez le nourrisson, la composition du microbiote intestinal est unique à chaque individu bien que plus de 95 % des bactéries le composant puissent être réparties en 4 phyla majeurs (**Landman et Quévrain,2016**).

Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans l'homéostasie du tractus digestif, et plus globalement dans celle de son hôte, en remplissant des fonctions métaboliques, immunologiques, et structurales, ainsi qu'en jouant un rôle essentiel dans la protection de l'intestin contre la colonisation par des bactéries pathogènes(**Ribiere,2015**).

La composition du microbiote intestinal pourra varier en fonction de nombreux facteurs tels que l'alimentation, le mode de vie, l'environnement, l'apparition de pathologies et les traitements médicamenteux. Un déséquilibre (dysbiose) persistant du microbiote intestinal en lien avec une modification de l'abondance ou de l'activité de certaines espèces bactériennes peut conduire directement ou indirectement à des pathologies digestives (inflammations chroniques comme la maladie de Crohn, syndrome de l'intestin irritable,et cancers) mais aussi à des pathologies extra-intestinales (diabète, obésité, maladies cardio-vasculaires, syndromes métaboliques) (**Marre et al., 2020**).

Récemment, les polluants environnementaux sont devenus une menace majeure pour la santé et sont en augmentation. Des études ont montré la relation profonde entre le microbiote intestinal et notre santé (**Jin et al.,2017**). Cette accord décrit les effets possibles des polluants tels que les fongicides.

Les fongicides sont surtout utilisés dans l'agriculture pour détruire ou combattre les ravageurs et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux qui peuvent causer des endommagements aux denrées alimentaires et aux produits agricoles .Parmi les fongicides, nous pouvons citer le tébuconazole (TEB). L'exposition de l'homme au TEB peut se produire par l'intermédiaire de résidus dans l'alimentation, par inhalation ou contact cutané dans les zones rurales où ce fongicide est appliqué(**Ben Saad et al.,2017**).Plusieurs études ont montré ses risques potentiels, notamment lors d'expositions prénatales, d'apprentissage cognitif, de développement de neuropathologie(**Moser et al., 2001**)ou en tant que perturbateur endocrinien .Il augmente la durée de gestation et influe sur les niveaux d'hormones stéroïdiennes chez le fœtus. Différents mécanismes d'action sur la biosynthèse de ces

Introduction

hormones ont été mis en évidence. Le tébuconazole entraîne une diminution de la formation d'œstradiol et de testostérone et augmente la formation de progestérone, ce qui implique une inhibition des enzymes impliquées dans la conversion de la progestérone en testostérone. Il agit également en tant qu'antagoniste du récepteur androgène conduisant à une féminisation de la progéniture des rats (Youness, 2013).

A la lumière de ces données, la restauration du microbiote intestinal constitue actuellement une stratégie très importante dans la prévention des pathologies métaboliques induites par les perturbateurs endocriniens. Cette stratégie est basée sur l'utilisation des biomolécules d'origine naturelle. Parmi les bio-ressources naturelles riches en molécules bioactives, les feuilles de deux plantes médicinales *Rosmarinus Officinalis.L.* et *Salvia Officinalis.L.*, Ces dernières occupent une place d'excellence et un choix à prendre en considération dans cette approche. En effet, *Rosmarinus Officinalis L.* et *Salvia Officinalis* sont des plantes aromatiques originaires de la région méditerranéenne, elles sont largement décrits pour leur rôle antioxydant, leur effet potentialisateur de l'insuline, modulateur du microbiote intestinal et pour leur activité anti-inflammatoire et anti-tumorale ainsi leurs effets dans la prévention des pathologies métaboliques à stress oxydatif telles que les maladies cardiovasculaires (Fadi., 2011 ; Neagu et al., 2011 ; Miraj et Kiani, 2016 ; Ghorbani et Esmailizadeh, 2017) .

Cependant, malgré l'évidence de leurs intérêts potentiel dans la prévention de plusieurs pathologies, peu de travaux à ce jour se sont intéressés à vérifier l'effet des extraits des *Rosmarinus Officinalis.L.* et *Salvia Officinalis.L.* et à estimer leur effet *in vivo* de leurs composés sur la prévention des désordres métaboliques induites par les perturbateurs endocriniens et la dysbiose intestinale.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de ce mémoire, dont l'objectif est d'étudier les potentielles perturbations du microbiote intestinal murin induites par l'exposition à un polluant environnemental ,le tébuconazole. Ainsi que l'évaluation des effets des extraits des feuilles de *Salvia officinalis.L* et *Rosmarinus officinalis L.* sur les variations qualitatives et quantitatives de la communauté intestinale.

Chapitre I :
Matériel et méthodes

Objectifs de l'étude

La présente étude a eu comme objectif d'alléger l'impact d'un contaminant environnemental à savoir le tébuconazole sur la composition du microbiote intestinal des jeunes rates *Wistar* exposées à une dose journalière tolérable admissible, et l'évaluation des dommages causés par l'usage de deux plantes médicinales (*Rosmarinus officinalis .L*) et (*Salvia officinalis.L*), ceci à travers la quantification et l'identification de quelques bactéries contenues dans ce microbiote.

lieu et durée de travail

La démarche expérimentale relative à cette étude a été réalisée sur une période s'étalant du 27 janvier 2022 au 12 juin 2022 et a été effectuée au sein des laboratoires suivants

- Laboratoire d'Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales, « Université Ibn Khaldoun – Tiaret ».
- Laboratoire d'Hygiène et Pathologie Animale de l'Institut des Sciences Vétérinaires, « Université Ibn Khaldoun –Tiaret ».
- Laboratoire de Microbiologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie « Université Ibn Khaldoun –Tiaret ».

Matériel et produits chimiques

Le matériel, les produits chimiques et les milieux de culture nécessaires à l'accomplissement de ce travail sont cités dans le tableau ci-après :

Tableau n° 01 : Matériel, réactifs et les milieux de culture utilisés

Matériel et appareillages	Produits et réactifs	Milieux de cultures
<ul style="list-style-type: none"> • Agitateur magnétique • (Rotmag) • Autoclave(Sanoclave) • Balance analytique (Ohaus) • Bec Bunsen • Dessiccateur • Etuve (Memmert) • SpectrophotomètreUV-Vis(Shmadzu) • Microscope optique(Optica) • Micropipette (C.labo) • Broyeur (Mouninex) • Tamis (0,5 mm) • Boîtes de Pétri 	<ul style="list-style-type: none"> • Eau oxygénée (30%) • Eau physiologique (0,9%) • Ethanol (70%) • Violet de gentiane • Fuchsine • Lugol • Alcool (95%) • Huile d'immersion • Galerie Api 20E • Huile de paraffine • Réactifs Voges Proskauer (VPI et VP II) • Réactifs TDA • Réactif de Kovacs 	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose Chapman • Gélose MacConkey • Gélose Man, Ragoza, Sharpe (MRS)

Matériel végétal

Les deux plantes qui ont fait l'objet de notre étude sont :

- Le *Rosmarinus officinalis.L* (le romarin) est récoltée au niveau de la région de Freneda en mois de Janvier 2022.
- la *Salvia officinalis.L* (la Sauge) est récoltée au niveau de la région de Tiaret en mois de Février 2022.
- Les deux plantes : *Rosmarinus officinalis.L* et *Salvia officinalis.L* ont été identifiées au sein de la faculté des Sciences de la Nature de la Vie par un enseignant botaniste de l'Université **Ibn Khaldoun Tiaret**.

Le choix d'utiliser c'est deux plantes, par le fait qu'elles sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle (**Duke,2000**).

Traitement et suivi des animaux

Les animaux utilisés au cours de cette expérimentation sont des jeunes rates, de souche *Wistar* âgées de 4 à 6 semaines présentant un poids initial compris entre de 120-140 g.

Ces animaux ont été fournis par l'institut Pasteur d'Alger-Kouba, des femelles ont été choisies préférentiellement car elles représentent une cible particulièrement sensible aux perturbateurs endocriniens.

Dès leur réception, les animaux ont été répartis en 4 groupes de 6 individus. Les différents lots constitués représentaient des moyennes de poids corporels relativement égaux. Chaque rate a été logée individuellement dans une cage en polypropylène.

Les rates ont été hébergées au sein de l'animalerie du laboratoire d'autopsie clinique de l'institut des Sciences Vétérinaires (Université Ibn Khaldoun – Tiaret) où règne une température constante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), elles ont eu accès à volonté à la nourriture et à la boisson.

Une période d'adaptation de 07 jours a été allouée aux rates avant le début du protocole expérimental. Après cette période et pendant 16 semaines, les rates ont été nourries avec un régime standard, et exposées ou non à un polluant environnemental (le tébuconazole) à une dose de ($30\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) par voie orale via l'eau de boisson fournie dans des biberons et traitées ou non aux extraits éthanoliques de *Rosmarinus officinalis.L* ou *Salvia officinalis.L*.

L'étude a été effectuée pendant une période de 16 semaines durant laquelle, un suivi quotidien de la consommation alimentaire, l'eau de boisson, du poids corporel et du comportement des animaux a été effectué.

Les 4 lots préalablement constitués ont été soumis aux conditions ci-dessous.

- Les animaux du premier lot (ST) ont reçu un régime Standard à base d'amidon (42,12) et une eau de boisson (l'eau de robinet).
- Le second lot (ST/TEB) a reçu à un régime Standard (ST) et exposé au Tébuconazole (TEB) à 30 µg/kg/j.
- Le troisième lot (ST/TEB/EXT01) a reçu à un régime Standard (ST), exposé au TEB (30 µg/kg/j) et traité par voie orale (gavage) d'un extrait éthanolique de *Rosmarinus Officinalis*(100mg/kg/j).
- Le quatrième lot (ST/TEB/EX02) a été soumis à un régime standard exposé au TEB (30 µg/kg/j) et traité par l'extrait de la sauge (*Salvia Officinalis L.*)(100mg/kg/j)

Composition du régime expérimental

La préparation du régime alimentaire, au cours de cette expérimentation, a été réalisée deux fois par semaine au sein de laboratoire d'Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales. Les ingrédients utilisés pour préparer ce régime ont été fournis gracieusement par l'Office Nationale d'Aliment de Bétail (ONAB) de Rahouia La composition du régime standard figure dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2: Composition du régime experimental(Sauvant *et al.*, 2004).

	Standard (%)
Amidon	42,12
Cellulose	3,34
Protéines	14,406
Matière grasse	0
Energie (kcal/100g)	409,615

**Choix de la dose, de la voie d'administration et de la stratégie d'exposition
autébuconazole**

Afin d'imiter les conditions environnementales et éviter le stress pouvant affecter les animaux traités, l'exposition aux TEB a été effectuée par voie orale via l'eau de boisson (l'eau de robinet), la doses étudiée est de 30 µg/kg/j corresponde à la dose journalière admissible (DJA) chez l'homme. Le choix de cette dose d'exposition repose sur le fait que le TEB ne suive pas les dogmes classiques de la cytotoxicité.

Il agisse en effet à de très faibles dose, qui peuvent être largement en dessous de la dose journalière admissible, sans suivre pour autant une relation linéaire dose/effet.

Le choix de l'administration du TEB, par voie orale via l'eau de boisson, est justifié par le fait que cette méthode permet d'effectuer une exposition chronique répétée et répartie sur la journée(Lecorre et *al.*, 2013).La consommation de l'eau de boisson seule ou associée au tébuconazole a été vérifiée chaque jour.

I.8 Procédure expérimentale

La procédure expérimentale suivie au cours de cette étude est récapitulée dans l'organigramme suivant :

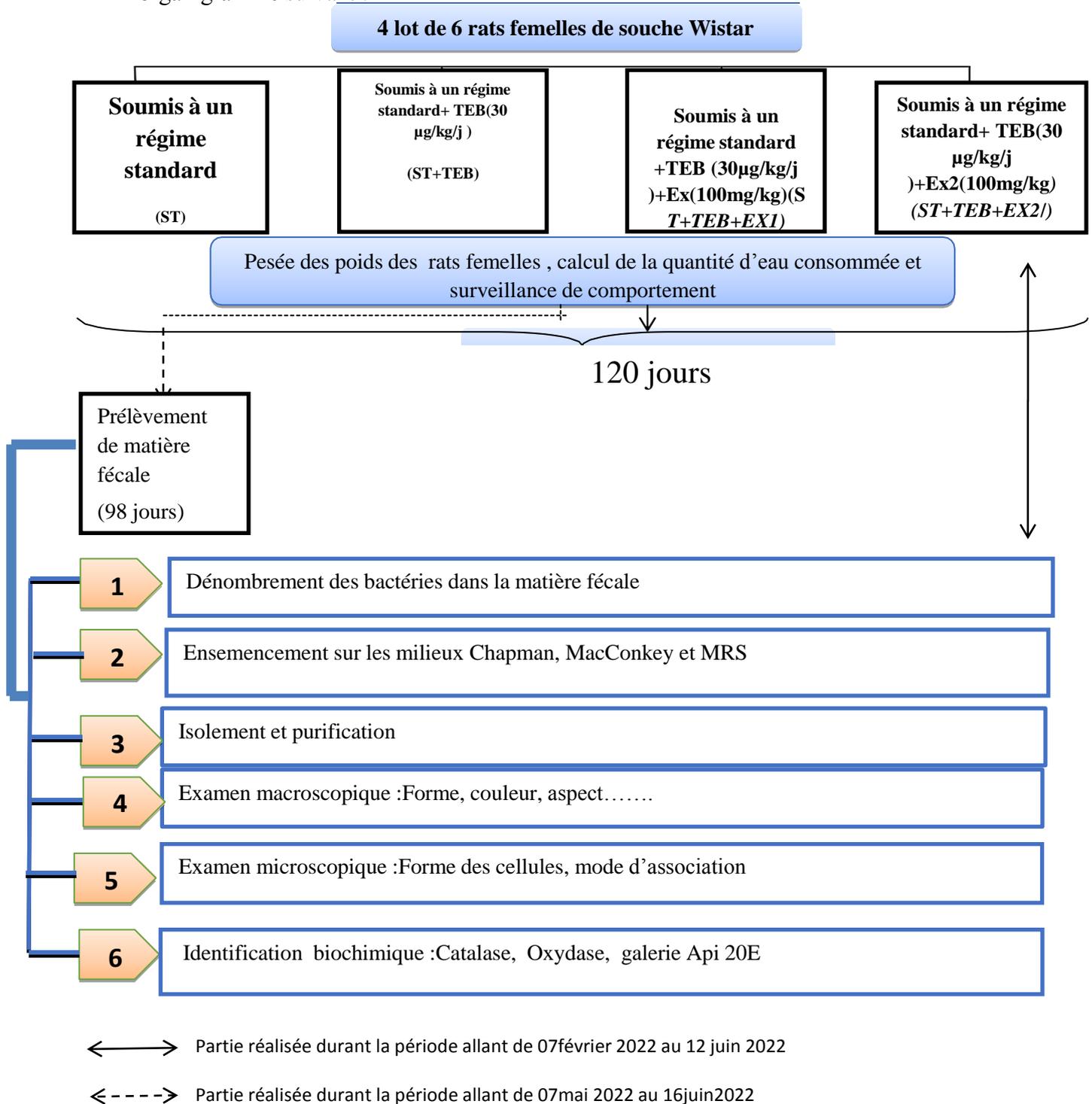


Figure n°01 : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale

Préparation des extraits éthanoliques de *Rosmarinus Officinalis* et *Salvia officinalis* Les feuilles de chaque plante ont été soigneusement nettoyées et séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ces dernières ont été ensuite broyées à l'aide d'un broyeur mécanique (Pulverisette, Fritsch, Allemagne) et tamisés dans un tamis ayant un diamètre de 500 µm. L'extraction des composés phénoliques a été effectuée par le biais de la technique de macération. Une masse de 10g de matière végétale sèche sous forme de poudre a été macérée dans 100 ml d'éthanol 70%. Après une agitation de 24 h à température ambiante et à l'obscurité, une filtration a été faite sur papier filtre 1mm. Le filtrat obtenu a été débarrassé de son solvant par évaporation à 50°C et ce afin d'obtenir un extrait sec. Ce dernier a été conservé à -20°C pour les éventuelles expérimentations (Lumbo et al., 2005)

Etude des effets des extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Salvia officinalis* sur la composition du microbiote intestinal murin exposé au tébuconazole.

Pour étudier l'effet préventif des produits bioactifs des plantes médicinales *Rosmarinus officinalis* et *Salvia officinalis* contre la toxicité induite par le tébuconazole via la modulation de la flore intestinale, nous avons recherché quelques bactéries impliquées dans l'altération de la composition. Cette recherche consiste à faire des analyses de routine de la flore intestinale qui se limitent aux germes cultivables, elle est basée sur le dénombrement et l'identification de quelques bactéries au niveau fécal. Pour ce faire, 1g de matière fécale fraîche à l'émission a été prélevée avant le sacrifice. Ces derniers ont été déposés dans 9 ml d'eau physiologique (0,9%) et dans des conditions stériles. Les principales bactéries de la flore intestinale recherchées dans les matières fécales sont : *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* et Staphylocoques.

I.11.1. Dénombrement de quelques bactéries dans la matière fécale

I.11.1.1. Dénombrement des *Enterobacteriaceae* sur la gélose Mac Conkey

Les Entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif constituant un ensemble important de bactéries et comportent de nombreux pathogènes (Tortora et al., 2003).

Leur dénombrement consiste à dissoudre 1g de matière fécale dans 9 ml de l'eau physiologique à 0,9%. La solution a été homogénéisée à l'aide d'un vortex, et laisser un bon moment pour précipiter. À partir de cette dernière, des dilutions décimales ont été préparées jusqu'à 10⁻⁶ ensuite pour chaque dilution, des étalements en surface ont été réalisés à la

surface de gélose MacConkey .Les boites de Pétri ont été étalées puis incubées à 37°C

pendant 24 h. Cette étape a été suivie par des observations macroscopiques des colonies bactériennes basées sur l'étude des caractères cultureux (aspect des colonies, couleur, taille, forme...). Un comptage, une identification microscopique et biochimique, par le biais d'une galerie Api 20E, des colonies ont été réalisées(Chouder et al., 2006).

Dénombrement des *Staphylocoques* sur la gélose Chapman

Les Staphylocoques sont des bactéries sphériques à Gram positif qui s'assemblent en grappe de forme irrégulière (Tortora et al., 2003). Le dénombrement de ces dernières consiste à étaler 0,1 ml des dilutions décimales à la surface de gélose Chapman. Après incubation, un comptage et l'identification de ces bactéries ont été réalisés par des tests cultureux, microscopiques et biochimiques.

Dénombrement des *Lactobacillus* sur la gélose Man Ragosa Sharpe(MRS)

Le dénombrement des *Lactobacillus* consiste à ensemencer en profondeur la gélose MRS à partir des dilutions décimales préparées comme décrit précédemment. L'homogénéisation est faite en effectuant des mouvements circulaires en forme « 8 », l'incubation a été effectuée dans des conditions d'anaérobiose à 37°C pendant 24h (Mallem et al.,2004). L'étude des caractères cultureux, morphologiques et biochimiques ont été réalisées.

I.12.Isolement et purification des bactéries obtenues

Les colonies obtenues ont été sélectionnées, prélevées ensuite ensemencées par plusieurs repiquages successifs sur les milieux appropriés par la méthode de stries jusqu'à l'obtention des isolats purs.

I .13. Tests d'identification des bactéries recherchées

I .13.1.Caractères morphologiques

- **Examen macroscopique**

Il a été basé sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation (couleur, taille, contour, aspect, ...).

- **Examen microscopique**

Il permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes par la coloration de Gram(Annexe N°05).(Meriah et Nabi, 2017).

I.13.2.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)(**Sobhani et Wyatt.,2000**).

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(**Delarras, 2014**).

-Technique

Ce test a été réalisé en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H₂O₂. La libération de bulles indique une réaction positive (**Levy et al., 1992**)

Test**d'oxydasePrincipe**

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

Un disque d'oxydase a été imbibé par une goutte d'eau distillée stérile ensuite une partie de colonie a été déposée sur le disque à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile. Une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes (**Kovacs et al., 1995**).

Identification des *Enterobacteriaceae* par la galerie Api 20E**Technique :**

A partir d'une culture jeune de 18 h d'incubation, une suspension bactérienne a été préparée dans l'eau physiologique stérile (0,9%). La turbidité de cette suspension a été ajustée à 0.5 Mac Farland. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,13 à 625nm ce qui

corresponde à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml. L'inoculum ainsi ajusté a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes de la galerie (Nguyen, 2000). L'ensemencement des tubes s'effectue par les techniques suivantes :

- Remplissage à la fois du tube et de cupule pour les tests CIT, VP.
- Remplissage du tube qui est ensuite recouvert par l'huile de paraffine pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE.
- Remplissage du tube uniquement pour les autres tests

- Lecture

Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs (**Annexe 4**).

Chapitre II :
Résultats et discussions

Dénombrement des *Enterobacteriaceae*

Les résultats obtenus dévoilent qu'une exposition pendant 16 semaines au Tébuconazole (TEB) altère le microbiote intestinal des jeunes rates via une augmentation du nombre des *Enterobacteriaceae* évalué à 17% par rapport au groupe témoin(**Figure 2**)

Cependant, le traitement des rates par l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* induit une réduction de la charge bactérienne des entérobactéries estimée de 16% en comparaison au groupe(ST/TEB).

Néanmoins, aucune différence n'a été observée chez le groupe des rates traité par l'extrait de *Rosmarinus officinalis.L* et exposé au (TEB) par rapport au groupe (ST/TEB).

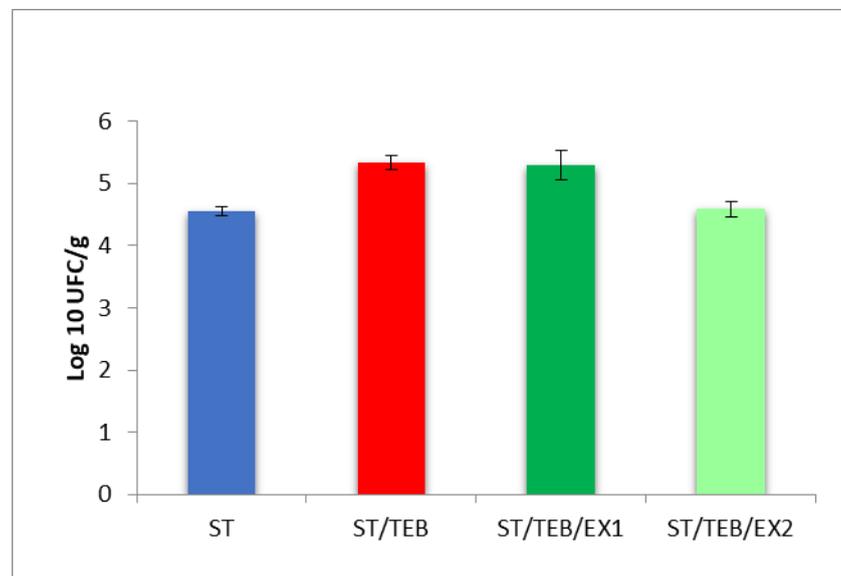


Figure 2: Dénombrement des *Enterobacteriaceae* chez les différents groupes expérimentaux

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ES avec $n=6$

Dénombrement des *staphylocoques*

Les résultats du dénombrement des staphylocoques au niveau de la matière fécale sont indiqués dans la **Figure 3** . Ces derniers dévoilent que l'exposition des rats femelles au(TEB) n'induit aucune variation dans le nombre des staphylocoques chez le groupe(ST/TEB) comparativement au groupe standard (4,48 log₁₀ UFC/g vs 4,39 log₁₀ UFC/g).

En revanche, une légère diminution a été révélée chez les rates traitées par voie orale par l'extrait éthanolique de Romarin (*Rosmarinus officinalis.L*) par rapport au groupe des rates exposé au TEB seul, cette diminution est évaluée à 7%.

Par ailleurs ,la quantification des staphylocoques n'indique aucune différence entre le groupe des rates traité par l'extrait éthanolique de la sauge (*Salvia officinalis.L*) et le groupe non traité par le même extrait et exposé au TEB (ST/TEB).

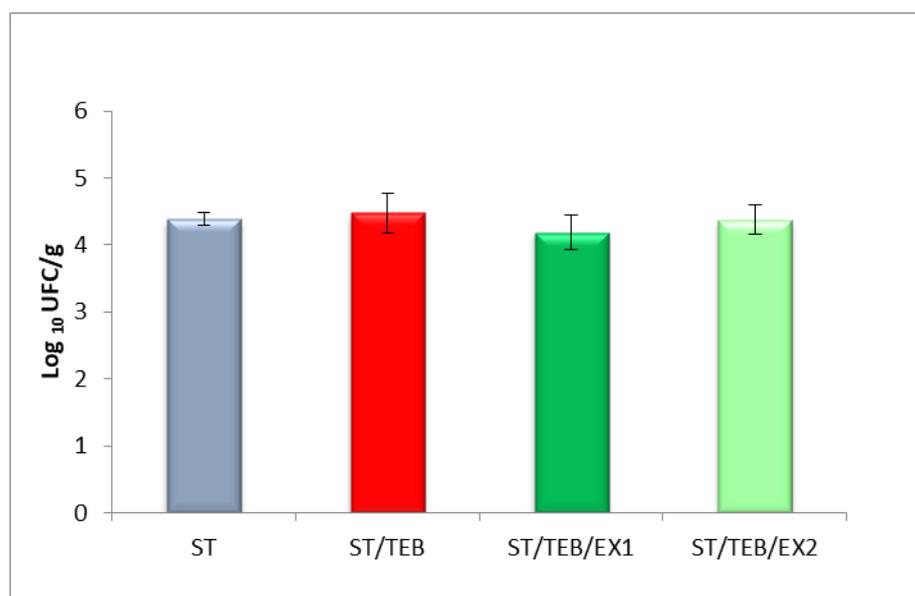


Figure 3: Dénombrement des *Staphylocoques* chez les différents groupes expérimentaux

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ES avec n=6

Dénombrement des *Lactobacillus*

Les résultats du dénombrement des *Lactobacillus* par la méthode de comptage sur milieu solide au niveau de la matière fécale (**Figure 4**) ont révélé une réduction du nombre de ces bactéries chez le groupe (ST/TEB) par rapport au groupe témoin (ST). Cette diminution est évaluée à 20%.

Cependant, une augmentation est estimée de 22% dans le nombre de *Lactobacillus* a été révélée dans la matière fécale chez le groupe ayant traité par l'extrait de la sauge et exposé au (TEB) associé au régime standard (ST /TEB/ EX2) par rapport au groupe(ST/TEB).

Aussi une augmentation de la concentration de *Lactobacillus* a été observée chez le groupe traité par l'extrait de romarin (ST/TEB/EX1)(4,12log₁₀ UFC/g) versus le groupe non traité par l'extrait de romarin ST/TEB(3,77 log₁₀UFC /g).

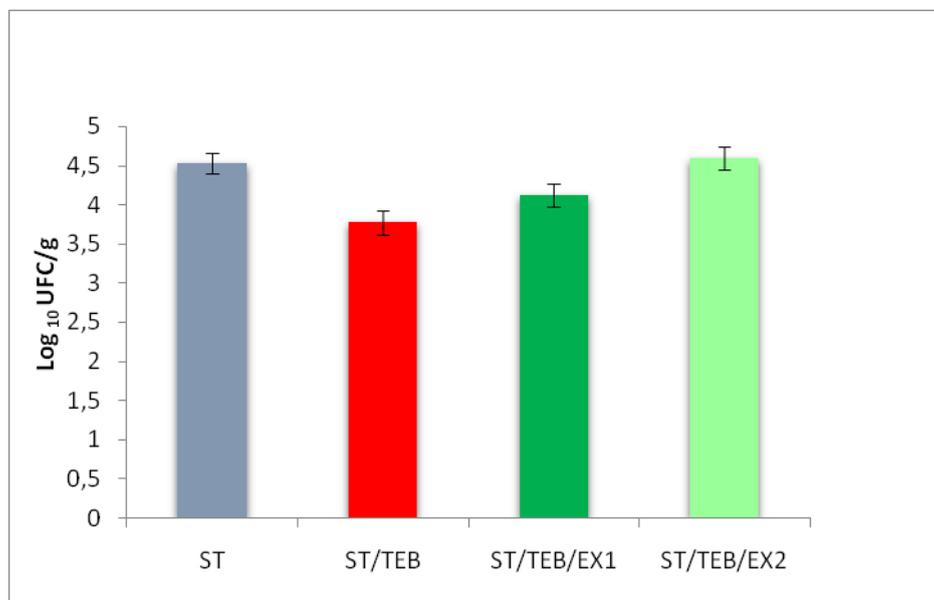


Figure04 : Dénombrement des *Lactobacillus* chez les groupes expérimentaux durant les 16 semaines de traitement.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ES avec n=6

Identification des bactéries isolées à partir de la matière fécale

Identification des *Entérobactéries*

Caractères morphologiques

Les résultats de l'identification basée sur les tests morphologiques et biochimiques sont présentés dans le tableau 3

L'observation macroscopique des cultures des bactéries isolées à partir des matières fécales des différents groupes des rates sur la gélose Mac Conkey révèle plusieurs aspects

morphologiques des colonies à savoir : colonies rondes, aspect muqueux, de couleur rose à bord irrégulier avec un diamètre de 2 à 3 mm ont été constatées dans les isolats issus des matières fécales du groupe des rats témoins (ST).

Colonies de couleur beige, rondes, ont été observées dans les bactéries isolées à partir du groupe (ST/TEB)

Alors que, les bactéries isolées à partir des matières fécales des groupes (ST/TEB/EX1) et (ST/TEB/EX2) donnent des colonies, rondes de couleur rose à bord régulier avec un aspect muqueux.

Parallèlement, l'examen microscopique montre que les bactéries isolées sont bacilles ou coccobacilles isolées à Gram négatif.

Tableau n°03: Caractères macroscopique, microscopique des bactéries sur MacConkey isolées de la matière fécale

Echantillon Test	Témoin	ST+TEB	ST+TEB+EX1	ST+TEB+EX2
Macroscopique	colonies de couleur rose arrondies à bords réguliers	colonies de couleur beiges régulières	colonies de couleur rose arrondies régulières	colonies de couleur rose arrondies régulières
Microscopique	Bacilles à Gram négatif	Bacilles à Gram négatif	Coccobacilles à Gram négatif	Bacilles à Gram négatif

II.4.1.2. Identification biochimique

Les caractères biochimiques des bactéries isolées sur la gélose Mac Conkey sont représentés dans le tableau 04.

Dès l'apparition des colonies sur le milieu de culture, les bactéries ont été soumises à des tests biochimiques réalisés par des tests Catalase, oxydase et à l'aide de la galerie **Api 20E**.

Les résultats des caractères biochimiques sur Mac Conkey indiquent que la bactérie isolée à partir de la matière fécale du groupe témoin (ST) possède les enzymes catalase, β -galactosidase (ONPG), Ornithine décarboxylase(ODC), Lysine décarboxylase (LDC) et arginine dihydrolase (ADH), mais elle est dépourvue l'Uréease (URE), Tryptophane désaminase et Thiosulfate réductase (production de H₂S), ainsi cette espèce utilise le saccharose ,amygdaline et Citrate (CIT) dans son métabolisme .Ces résultats confirment l'identification de l'espèce *Enterobacter cloacae*.

Tandis que, la bactérie isolée du groupe ST/TEB ne possède pas les enzymes de l'arginine dihydrolase (ADH), β -galactosidase (ONPG), Ornithine décarboxylase(ODC), Lysine décarboxylase (LDC) et arginine dihydrolase (ADH). Ces résultats confirment l'identification de l'espèce *Acinetobacter baumannii*.

En outre, l'identification biochimique des bactéries isolées des matières fécales des rats des groupes ST/TEB/EX1 évoque que ces dernières ne possèdent pas les enzymes de Lysine décarboxylase (LDC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Ainsi elles utilisent le mannose et rhamnose dans leur métabolisme et elles produisent également l'indole. Ces résultats confirment l'identification de l'espèce *Escherichia coli*.

Tableau 4 :Caractères biochimiques des Entérobactéries isolés de la matière fécale

Groupes \ Test	ST	ST/TEB	ST/TEB/EX1
Catalase	+	+	+
Oxydase	-	-	-
ONPG	+	-	+
ADH	+	-	-
LDC	+	-	-
ODC	+	-	+
CIT	+	-	-
H₂S	-	-	-
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	+	-	+
V·P	+	+	-
GEL	-	+	+
GLU	+	+	+
MAN	+	-	+
INO	-	-	-
SOR	+	-	+
RHA	+	-	+
SAC	+	-	-
MEL	+	+	+
AMY	+	-	-
ARA	+	-	+
Espèces Identifiées	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Acinetobacter Baumannii</i>	<i>Escherichia coli</i>

(+) Résultat positif

(-) Résultat négatif

Pré-identification des staphylocoques et *Lactobacillus***Caractères morphologiques**

L'observation macroscopique des colonies cultivées sur la gélose Chapman, se traduit par l'apparition des colonies assez grandes, jaunes, arrondies, bombées, lisses. Alors que sur la gélose MRS et dans des conditions d'anaérobiose les résultats obtenus montrent l'apparition des petites colonies blanchâtres, rondes à bords réguliers(Tableau 5).

En parallèle, l'examen microscopique montre que les bactéries isolées sur la gélose Chapman sont Gram positives, coques ,disposées, en paire, groupés en amas. Cependant, les bactéries cultivées sur la gélose MRS ont une forme des cellules bacilles, elles révèlent une coloration de Gram positive.

Caractères biochimiques

Les résultats de pré-identification des bactéries isolées sur MRS révèlent que ces dernières ne possèdent pas les enzymes de catalase et de cytochrome-oxydase. Tandis que les bactéries isolées sur Chapman possèdent la catalase mais elles sont dépourvues l'enzyme de la cytochrome-oxydase .L'ensemble des résultats obtenus concernant les caractères morphologiques et biochimiques nous a permis de confirmer que les bactéries isolées sur les géloses MRS et Chapman appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Staphylococcus* ,respectivement.

Tableau n°05 : Caractères macroscopique, microscopique des staphylocoques et *Lactobacillus* isolés de la matière fécale

Groupes	Tests	Macroscopique		Microscopique		Biochimique	
	Milieux	Aspect	Couleur	Gram	Forme	Oxydase	catalase
ST	Chapman	Grande taille Bombées lisses arrondies	Jaune	Positif	Coques associées amas	-	+
	MRS	Petites tailles rondes à bords réguliers	Blanche	Positif	Bacilles	-	-
ST+TEB	Chapman	lisses arrondies	Jaune	Positif	Coques associées en amas	-	+
	MRS	Petites tailles rondes à bords réguliers	Blanche	Positif	Bacilles droits	-	-
ST+TEB+EX1	Chapman	Bombées lisses arrondies	Jaune	Positif	Coques associées en amas	-	+
	MRS	Petites tailles régulières	Blanche	Positif	Bacilles	-	-
ST+TEB+EX2	Chapman	Bombées lisses arrondies	Jaunes	Positif	Coques associées en amas	-	+
	MRS	Petites tailles ronds à bords réguliers	Blanche	Positif	Bacilles	-	-

Lactobacillus

Staphylocoque

Discussion

La population humaine est exposée à de très nombreux contaminants chimiques environnementaux et alimentaires, ces expositions pourraient perturber le microbiote intestinal, acteur clé de la santé humaine. De nombreuses études se sont penchées sur le lien entre les polluants environnementaux et la dysbiose intestinale (**Comtet et al., 2020**).

Nos résultats révèlent que suite à l'exposition des rats aux polluants (le tébuconazole) une augmentation du nombre des bactéries pathogènes *Enterobacteriaceae* et staphylocoques a été constatée chez les rats exposés au TEB par rapport au groupe des rats témoins (ST), Ces résultats sont conformes avec ceux obtenus par **Jiang** et ses collaborateurs (**2020**) qui ont dévoilé que des rats exposés à une dose de 0,4 mg/l de tébuconazole influence le microbiote intestinal et favorise l'augmentation du nombre des Entérobactéries. Aussi **Liu et al.(2021)** ont démontré que des souris exposées au TEB ont un nombre élevé des Entérobactéries et des lipopolysaccharides (LPS). Ceci a été confirmée par **Fang** et ses collaborateurs (**2019**) qui ont confirmé que LPS est largement considéré comme la principale endotoxine entraînant une inflammation en activant le gène de réponse inflammatoire, par conséquent l'inflammation endommage la barrière intestinale et accélère la fuite de LPS de l'intestin vers le sang.

Nos résultats vont de même avec ceux menés par **Xu** et ses collaborateurs (**2014**). Ces derniers ont dévoilé qu'une exposition à l'epoxiconazole (fongicide) altère la communauté microbienne intestinale en augmentant le nombre des Entérobactéries.

Une autre investigation réalisée par **Claire** et ses collaborateurs (**2019**) qu'ils ont rapporté que l'exposition des rates à de faible dose de pesticides, chlorpyrifos pendant la gestation et au cours de la vie néonatale provoque chez sa descendance un déséquilibre de l'homéostasie intestinale. En outre, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Charron (2016)**, qu'exhibe que les rats exposés au chlorpyrifos présentent une augmentation dans le nombre des Staphylocoques.

Cependant, le traitement des rates par les extraits éthanoliques de Romarin ou de la Sauge induisent une diminution du nombre des *Enterobacteriaceae* et *Staphylococcus*. Cette diminution se traduit par l'effet bénéfique des composés bioactifs des extraits de *Rosmarinus officinalis* L.(Romarin) et *Salvia officinalis* L.(Sauge) qui sont les polyphénols.

Plusieurs études démontrent l'action métabolique de ces extraits sur la composition du microbiote intestinal (**Ou et al., 2018 ; Verkhovodova et al., 2020**) et leurs effets antimicrobiens vis à vis des bactéries pathogènes (**Perez-Burillo et al.,2020**). Ces données confirment celles obtenues par **Moreno et al. (2006) ; Sirocchi et al. (2013)**. Les extraits de *Rosmarinus Officinalis* L.(Romarin) sont très riche en composés phénoliques. Sa particularité

réside en sa richesse en polyphénols. Celle-ci est majoritairement composée de carnosol, d'acide carnosique, acide rosmarinique et hespéridine (**Tai et al., 2012**). Cette composition lui a attribué plusieurs propriétés thérapeutiques. En effet, une étude réalisée par **Mahgoub et al. (2019)** évoque que le traitement par l'extrait de *Rosmarinus officinalis* L. réduit significativement les populations d'*E.coli* et de *Salmonella spp.* chez la caille japonaise.

Une autre investigation montre que les polyphénols de Romarin inhibent la croissance des bactéries pathogènes, telles que les *Enterobacteriaceae* et *Staphylococcus* (**Moreno et al. 2006 ; Mouas et al., 2017**). Cette activité antimicrobienne peut s'expliquer par une diminution du pH de la lumière intestinale par les polyphénols qui affecte de manière significative le profil intestinal.

En outre, une réduction de la croissance des Entérobactéries a été marquée par les huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. (**Benkherara et al., 2015**). Aussi **Daoudi** et ses collaborateurs en (**2013**), confirment l'effet antimicrobien de l'extrait éthanolique de la Sauge vis à vis certaines bactéries potentiellement pathogènes à savoir *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

D'autre part, les résultats de notre étude dévoilent que le traitement des rates par les extraits éthanoliques de Romarin ou de la Sauge favorisent la croissance des *Lactobacillus* au niveau fécal chez des rates exposées au TEB par rapport au groupe non traité par l'extrait et exposé au TEB. Ces résultats sont conformes aux ceux obtenus par **Ziarno** et ses collaborateurs (**2021**) qui ont rapporté que les composés polyphénoliques de la Sauge stimulent la croissance des Lactobacilles dans la boisson à base de lait fermenté. Cette augmentation peut être expliquée par l'effet des polyphénols qui stimule sélectivement la croissance de *Lactobacillus*, par le biais de l'activité prébiotique.

Récemment, **Ali** et ses collaborateurs (**2021**), suggèrent que l'extrait de romarin peut potentiellement se comporter comme un prébiotique, grâce à ses polyphénols qui induisent une augmentation de la croissance de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium longum*, deux bactéries ayant un fort potentiel probiotique. Ces résultats sont prometteurs et apportent une validation scientifique à l'usage massif de ces plantes.

Conclusion

Conclusion

Il est actuellement admis que les polluants environnementaux tels que les pesticides interviennent dans la genèse et la complication de nombreuses pathologies d'origine digestives et extradiigestives.

La quête d'une thérapie douce et naturelle qui apporte des résultats avantageux sans effets secondaires continue. Les chercheurs en phytothérapie ont manifesté un intérêt accru à l'utilisation de plantes médicinales ayant une activité bénéfique pour la protection contre la toxicité des polluants environnementaux

Ce travail a eu pour objectif de contribuer à l'élaboration de nouveaux composés naturels issus de deux plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle, il s'agit de *Rosmarinus officinalis* L. et *Salvia officinalis* L. plantes spontanées connues pour ses vertus thérapeutiques variées contre la toxicité induite par le Tébuconazole sur le microbiote intestinale murin. Les résultats obtenus après 16 semaines de traitement indiquent une augmentation des *Enterobacteriaceae* chez le groupe des rats exposés au tébuconazole par rapport au témoin, avec un taux d'augmentation de 17%, et une diminution évaluée à 20% du nombre *Lactobacillus* a été constatée.

En revanche, le traitement des rates par l'extrait de la sauge, module le profil bactérien intestinal par rapport au groupe non traité. En effet cet extrait réduit le nombre des *Enterobacteriaceae* (16,12%), et il augmente le nombre de la bactérie bénéfique *Lactobacillus* (22%). Alors que, l'extrait éthanolique de romarin provoque une réduction faible des staphylocoques (7%) et une augmentation du nombre de *Lactobacillus* (9,28%).

A la lumière de ces résultats, l'extrait éthanolique de la sauge joue un rôle modulateur sélectif de la flore intestinale via une stimulation des bactéries intestinales bénéfiques et une inhibition des bactéries pathogènes et contribué ainsi à la prévention nutritionnelle de la dysbiose intestinale.

Tous ces résultats sont assez discutables sur l'utilisation excessive des polluants environnementaux en générale et de pesticides surtout et d'envisager d'utiliser les plantes médicinales qui peuvent nous apporter des solutions intéressantes aux contraintes induites par les polluants environnementaux. Cependant, il est clair que des tests supplémentaires et des investigations plus profondes sont nécessaires à entreprendre afin de consolider ces résultats. Dans cette optique et dans la continuité de cette présente étude, il est fort intéressant d'envisager les perspectives suivantes :

- ✓ Approfondir l'étude de l'influence des extraits de plantes sur la

Conclusion

composition du microbiote intestinal via les techniques de biologie moléculaire (PCR et la métagénomique).

- ✓ Identification des composés bioactifs des extrait des plantes *Rosmarinus Officinalis* L. et *Salvia officinalis* L. en utilisant des techniques plus fines (Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse et HPLC).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Ali HI, Dey M, Alzubaidi AK, Alneamah SJA, Altemimi AB, Pratap-Singh A.(2021).** Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Supplementation on Probiotic Yoghurt: Physicochemical Properties, Microbial Content, and Sensory Attributes. *Foods*. 9;10(10):2393
- **Ben Saad H., Kammoun I., Zeghal Kh. M., Ben Amara I., Magné C., Hakim A.,** 2017.Effet du sélénium sur le stress oxydant au niveau des reins de rats traités par le tébuconazole.27: 35-42.
- **Benkherara, S., Bordjiba, O., &Djahra, A. B.** (2015). Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*. *Phytothérapie*, 13(1), 14-18.
- **Charron C.,** 2016. Exposition chronique du chlorpyrifos en association à un régime obésogène sur le microbiote intestinal chez le rat. Amiens: Laboratoire périToxINERIS.
- **Charron C.,** 2016. Exposition chronique du chlorpyrifos en association à un régime obésogène sur le microbiote intestinal chez le rat. Amiens: Laboratoire PériToxINERIS.
- **Chouder N.,** 2006. Contribution à l'étude des flores intestinales des poulets conventionnels sains. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie.
- **Comtet-Marre, S., Mosoni, P., &Peyret, P.** (2020). Effets des polluants environnementaux et alimentaires sur le microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* , 55 (5), 255-262.
- **Delarras C.,** 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier. France
- **Doudi M, Yahyaabadi S, Mosafa E.(2014).** In-Vitro Antibacterial Properties of Sage (*Salvia officinalis*) Ethanol Extract against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan J Res Med Sci* ;16(10).
- **Duke, JA, &Beckstrom-Sternberg, SM** (2000). *Manuel des menthes médicinales (Aromathématiques): Phytochimiques et activités biologiques, Bibliothèque de référence à base de plantes* (Vol. 1). Presse CRC.
- **Fadi, Z.** (2011). *le romarin, Rosmarinus Officinalis," le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal"* (Thèse de doctorat).

Références bibliographiques

- **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.
- **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.
- **Ghorbani A ., Esmailizadeh M., (2017)** .pharmacological properties of Salvia officinalis and its components .journal of Traditional and Complementary Medicine, p 01-02
- **Hadrich F., cherif S., Garbouni T., Sayari A., (2014)** .Antioxidant and lipase inhibitory activities and Essential oil composition of pomegranate peel extract .Journal of Oleo Science ,63 (5),p515
- **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.
- **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. ;Fuz. ;2017.**effects of environmental pollutants on gut microbiota in zebrafish (Danio. rerio).environ pollut.265 ;114844.
- **Kovacs L.G., Ballati P.A., Kroshman H.B., Pueppke S.G., 1995.**Transcriptional organisation and expression of nol XWBTUV. A locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by Rhizobium fredii USDA257.molecular microbiology.17 :923-933
- **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.
- **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. 12;10(4):835.
- **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.

Références bibliographiques

- **Mahgoub, SA, AbdEl-Hack, ME, Saadeldin, IM, Hussein, MA, Swelum, AA et Alagawany, M.** (2019). Impact de l'huile pressée à froid de *Rosmarinus officinalis* sur la santé, les performances de croissance, les populations bactériennes intestinales et l'immunocompétence de la caille japonaise. *Sciences avicoles* ,
- **Mallem wafa.,Diffellah Amel.,Mazar Meriem.,**2004.effet d'un probiotique *Lactobacillus plantarum* BJ 434 sur la flore endogène du poulet de chair.Mémoire de Master. Université jijel
- **Marre S., Mosoni P., Peyret P.,**2020.Effets des polluants environnementaux et alimentaires sur le microbiote intestinal.Elsevier.France.
- **Meriah S., Nabi I.,** 2017. L'incidence des bactéries multi-résistantes " bmr" en réanimation chu tlemcen: intérêt du portage digestif du 15 octobre 2016 au 28 février 2017. Mémoire de Master. Université Abou bekr belkaïd. Tlemcen. Algérie.
- **Miraj S ., Kiani S .,**(2016).A review study of therapeutic effects of *Salvia officinalis* L .
- **Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C.S.; Vojnov, A.A.** (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.*, 40, 223–231.
- **Moser, V.C., Barone, S., Smialowicz, R.J., Harris, M.W., Davis, B.J., Overstreet, D., Mauney, M. and Chapin, R.E.** (2001) The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. *Toxicol. Sci.* 62: 339-352.
- **Mouas, Y., Benrebaha, F. Z., & Chaouia, C.** (2017). ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DU ROMARIN *ROSMARINUS OFFICINALIS* L. *Revue Agrobiologia*, 7(1), 363-370.
- **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
- **Ou, J., Huang, J., Zhao, D., Du, B., & Wang, M.** (2018). Protective effect of rosmarinic acid and carnolic acid against streptozotocin-induced oxidation, glycation, inflammation and microbiota imbalance in diabetic rats. *Food & function*, 9(2), 851-860.
- **Pérez-Burillo, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., Valverde-Moya, Á. J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., ... & Rufián-Henares, J. Á.** (2021). Un protocole de fermentation discontinue in vitro pour étudier la contribution des aliments à la composition et à la fonctionnalité du microbiote intestinal. *Protocoles de la nature* , 16 (7), 3186-3209.

Références bibliographiques

- **Pérez-Burillo, S., Rajakaruna, S., Pastoriza, S., Paliy, O. et Rufián-Henares, J. Á. (2020).** La bioactivité des mélanoïdines alimentaires est médiée par le microbiote intestinal. *Chimie alimentaire* , 316 , 126309.
- **Références bibliographiques**
- **Rivière C.,2015.**Impact d'un polluant environnemental, le benzo[a]pyrène, sur le microbiote intestinal model murin. Thèse de Doctorat. Université d'Auvergne.France.
- **Scolarsresearchlibrary ,8(6) ,p300**
- **Sirocchi, V., Devlieghere, F., Peelman, N., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S. et Ragaert, P. (2017).** Effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. combinée à différentes conditions d'emballage pour prolonger la durée de conservation de la viande de bœuf réfrigérée. *Chimie alimentaire* , 221 , 1069-1076.
- **SobhaniI,Wyatt JI .(2000).**Histopathology of gastro duodenal inflammation :the impact of *Helicobacter pylori* .*Histopathology* .26 :1-15
- **Tai, J., Cheung, S., Wu, M., Hasman, D. (2012).** Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine* , 19, 436–443
- **TortoraG. ;FunkeB. ;caseC. ;MartinL. ; 2003.**Introduction à la microbiologie. Renouveau pédagogique. Canada
- **Verkhovodova Y, Kireyev I, Koshovyi O, Myha M, Osolodchenko T.(2020).** The effect of common sage extracts on the intestinal microbiota in experimental infectious colitis. *Georgian Med News.* (301):165-170.
- **Verkhovodova, Y., Kireyev, I., Koshovyi, O., Myha, M. et Osolodchenko, T. (2020).** L'EFFET DES EXTRAITS DE SAUGE COMMUNE SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA COLITE INFECTIEUSE EXPERIMENTALE. *Nouvelles médicales géorgiennes*
- **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
- **Ziarno M , Kozłowska M, Ścibisz I, Kowalczyk M, Sylwia Pawelec Anna Stochmal and Bartłomiej Szleszyński. (2021).**The Effect of Selected Herbal Extracts on Lactic Acid Bacteria Activity, *Appl. Sci.* , 11(9),

Annexes

Annexes N°01

Classification taxonomique :

La classification de la sauge est comme suit :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophy

Classe: Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : Salvia

Espèce : Salvia officinalis L



La classification du romarin est comme suit :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : Rosmarinus

Espèce : Rosmarinus officinalis



Annexes N°02



Figure N°01: Balance électronique



Figure N°02 : Agitateur



Figure N°03 : Filtrat



Figure N°04 : Extrait Éthanolique (Sauge)



Figure N°05 : Extrait Éthanolique (Romarin)

Annexes N°03



Figure N°06: répartition des lots



Figure N°07 : Régime standard



Figure N°08 : Gavage

Annexes N°04



Figure N°09: Autoclave



Figure N°10 : Microscope



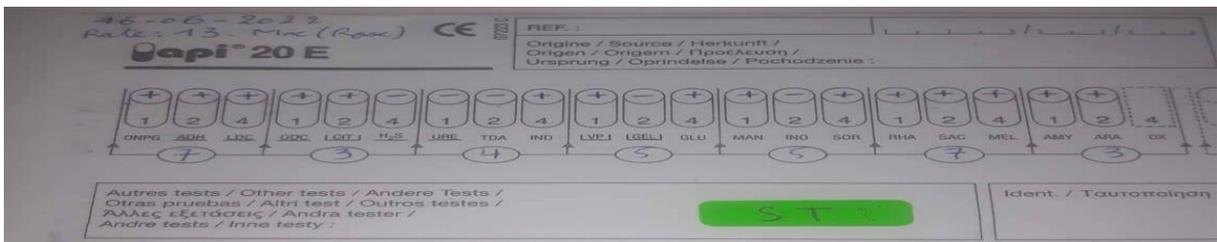
Figure N°11: Aspect des colonies des entérobactériaceae sur le milieu MacConkey



Figure N°12: purification des entérobactériaceae sur le milieu MacConkey



(a)



(b)

Figure N°13 : identification d'Enterobacteriaceae cloacae par galerie Api 20E

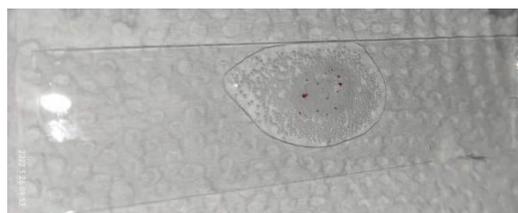


Figure N°14 :Test catalase

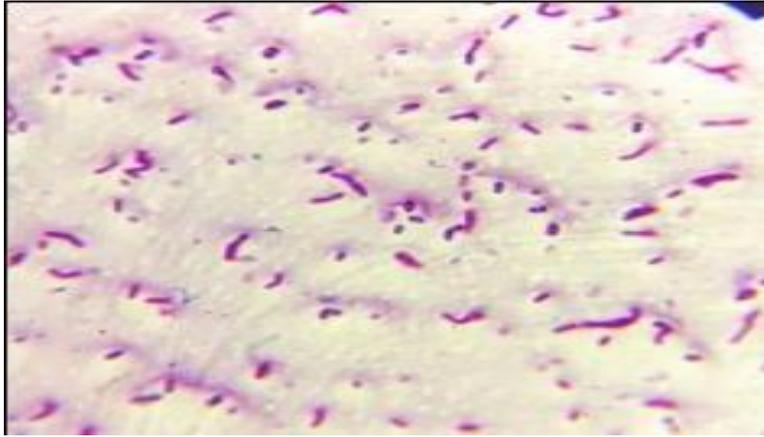


Figure N°15 :Aspect microscopique d'*Escherichia coli* du groupe des rates du groupe ST/TEB/EX1

Annexes N°05

Composition Des milieux de cultures

Composition Du milieu MacConkey

- 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

3 Composition de milieu MRS :

- Peptone 10g
- Extrait de viande 08g

Extrait de levure 04g

Acétate de sodium 05g

Phosphate bipotassique 2g

Citrate d'ammonium 2g

Sulfate de magnésium 7H₂O

0.2g

Sulfate de manganèse 4H₂O 0.05g

Glucose 20g

Tween 80 01 ml

Eau distillée qsp 100 ml

pH= 6,2

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

Résumé :

L'exposition intensive à des contaminations chimiques environnementales et alimentaires pourrait perturber la composition du microbiote intestinal, acteur clé de la santé humaine, ainsi participe à l'établissement de diverses pathologies chroniques. Plusieurs investigations se sont intéressés pour atténuer les perturbations causées par ces polluants dont la plus importante est l'utilisation des molécules bioactives. L'objectif de cette étude consiste à évaluer l'effet préventif de l'extrait des plantes médicinales à savoir ; *Rosmarinus officinalis* L. et *Salvia officinalis* L. contre les altérations causées par le tébuconazole sur le microbiote intestinal murin à travers la quantification, l'isolement et l'identification de la communauté bactérienne présent dans cet écosystème. Les résultats obtenus après 16 semaines de traitement indiquent une augmentation de 17% des *Enterobacteriaceae* dans la matière fécale des rates exposées au tébuconazole par rapport au témoin. Une diminution a été constatée chez *Lactobacillus* (20%). En revanche, le traitement des rates par l'extrait de la sauge, induit une réduction de la concentration fécale des *Enterobacteriaceae* (16%), et une augmentation des *Lactobacillus* (22%). Alors que, l'extrait éthanolique de romarin provoque une réduction faible des staphylocoques (7%) et une augmentation du nombre de *Lactobacillus* (9%). A la lumière de ces résultats, l'extrait éthanolique de la sauge est un bon modulateur sélectif de la flore intestinale via une stimulation des bactéries intestinales bénéfiques et une inhibition des bactéries pathogènes et contribué ainsi à la prévention nutritionnelle des désordres métaboliques induites per le TEB.

Mots clés : Microbiote intestinal murin, Tébuconazole, *Rosmarinus officinalis* L. *Salvia officinalis* L.

ملخص:

يمكن أن يؤدي التعرض المكثف للتلوث الكيميائي البيئي والغذائي إلى اختلال تكوين الجراثيم المعوية، وهي عنصر رئيسي في صحة الإنسان، وبالتالي المشاركة في إنشاء العديد من الأمراض المزمنة. ركزت العديد من التحقيقات على تخفيف المضطرابات التي تسببها هذه الملوثات، وأهمها

استخدام الحزبات النشطة بولوجيًا. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير الوقائي لمستخلص النباتات الطبية وهي: *Rosmarinus officinalis* L. و *Salvia officinalis* L. ضد التغيرات التي يسببها *tébuconazole* على الكائنات الحية المفيدة المعوية من خلال قياس الكمي والعزل وتحديد المجتمع البكتيري الموجود في هذا النظام البيئي. نشر النتائج التي تم الحصول عليها بعد 16 أسبوعاً من العلاج إلى زيادة بنسبة 17% في بكتيريا *Enterobacteriaceae* في فضلات الجرذان المعرضة لـ *Lactobacillus* (20%) من ناحية أخرى، فإن علاج الجرذان بمستخلص المريمية يؤدي إلى انخفاض في تركيز البكتيريا المعوية (16%)، وزيادة في العصيات البنية (22%)، وفي حين أن المستخلص الإيثانولي للكافور الجبل يؤدي إلى انخفاض ضئيف في المكورات العنقودية (7%) وزيادة في عدد بكتيريا *Lactobacillus* (9%) في ضوء هذه النتائج، فإن المستخلص الإيثانولي للمريمية هو معدل انتقائي جيد للنباتات المعوية عن طريق تحفيز البكتيريا المعوية المفيدة وتنشيط البكتيريا المريمية للأمراض وبالتالي يساهم في الوقاية الغذائية من المضطرابات التي تسببها TEB.

الكلمات الدالة: الجراثيم المعوية الجرذان، نيبوكونازول المريمية، الكافور الجبل