

UNIVERSITE DE SAÏDA - Dr MOULAY TAHAR
FACULTE DE SCIENCE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER
EN Biologie
OPTION : Microbiologie

Thème
Contribution à L'étude Antibactérienne Des Huiles
Essentielles De *Romarinus Officinalis* Et *Pistacia Atlantica*
Sur La Flore Intestinale Des Nouveaux Nés Et La Flore
Lactique

Présenté par **DJERMOUNI AICHA IKRAM ET BENDIDA FATMA MOUNIA**

Soutenu en Juin 2020, devant le jury composé de :

M. Terras

Président

M. Ammam. AEK

Promoteur

Mme. Ghouti Dalila

Examineur

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions **Allah**, le Tout Puissant, le Miséricordieux, qui nous a procuré la force et le courage pour poursuivre nos études et qui nous a donné l'opportunité de mener à bien ce travail.

Un grand remerciement à Monsieur **AMMAM. AEK** qui a bien voulu diriger le présent travail, pour le temps précieux qu'il nous a consacré, pour sa disponibilité et pour la justesse de ses remarques et critiques.

Nous tenons à remercier vivement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce modeste travail pour l'aide qu'ils nous ont accordé lors de l'élaboration de ce mémoire.

Un remerciement particulier est adressé à nos enseignants du département de Biologie (Faculté des sciences, Université de Saïda) qui ont su nous orienté et nous guidé durant notre cursus universitaire.

Nous terminons ces remerciements en exprimant notre profond respect et notre gratitude à l'égard du jury qui bien voulu accorder son intérêt à notre travail en acceptant de l'analyser et de l'examiner.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents que Dieu me les garde.

A mes très chères frères et sœurs pour leurs soutiens et encouragements

A mon encadreur monsieur **Ammam. AEK** pour sa disponibilité et ses orientations.

A toute ma famille

A mes très chères amis : Ikram, hayam, karima et Amina avec qui j'ai partagé tous les moments et les souvenirs (les beaux et les amères),

Et tous mes collègues de la promotion

A tout le monde ...

Mounia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

À celui qui m'a indiqué la bonne voie et qui a toujours été là pour moi, dans ma vie et mes études...

Mon père

À celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation...

Ma mère

Mon encadreur : Mr : **AMMAM .AEK** qui a su, par sa persévérance et son engagement guider mes pas tout au long de la réalisation de ce travail, seul le bon Dieu saura le récompenser. Je n'oublierai également jamais cette maitresse de la maternelle qui a pu installer et graver dans ma petite tête d'écolière l'amour de savoir et de la connaissance.

Mon frère Henifi, , mes sœurs (Amina, Nassima, Chaimaa) et mes oncles, mes tantes et leurs enfants ainsi que mes amis sont vivement remerciés pour leur soutien et pour avoir supporté mes caprices.

Si j'ai l'aval de dédicacer cette modeste contribution je la dédierai en premier lieu à l'Université de Saida pour tout ce qu'elle a fait de moi et pour moi.

Je la dédie aussi à tous les membres de notre Promotion Amina, Karima et Hayam pour l'amitié et la bonne Entente qui ont fait sa particularité tout au long des cinq années de formation.

Ikram

Table des matières

Introduction générale	01
Chapitre 01 : La flore intestinale	
1. Définition	02
2. Les facteurs influençant la flore microbienne digestive	03
2.1. Les facteurs génétiques	03
2.2. L'environnement et les conditions d'hygiène	03
2.3. Antibiothérapie	03
2.4. Mode d'accouchement	04
2.5. Mode d'alimentation	05
3. Les fonctions du microbiote intestinal	06
3.1. Fonction protectrice	06
3.1.1. Maintien de l'intégrité cellulaire	06
3.1.2. Protection contre les bactéries pathogènes	07
3.2. Fonctions métaboliques et nutritionnelles	07
3.2.1. Métabolisme des glucides	08
3.2.2. Métabolisme des lipides	11
3.2.3. Métabolisme des protéines	12
3.2.4. Métabolisme des gaz	12
3.3. Effet barrière	12
3.4. Microbiote intestinal et système immunitaire	13
4. Le développement de la flore intestinale chez le nouveau-né	15
4.1. La période prénatale	15
4.2. La période postnatale	15
Chapitre 02 : L'allaitement maternel	
1. Définition du lait	17
2. Le lait maternel	17
2.1. La composition du lait maternel	17
3. Les facteurs bioactifs du lait maternel	22
4. La flore du lait maternel	24
5. Importance de l'allaitement pour le nourrisson et la mère	25
5.1. Maladies infectieuses	25
5.2. Maladies chroniques	25
5.3. Effets cognitifs	25
5.4. Bénéfices pour la mère	26
Chapitre 03 : Les plantes utilisées	
1. La plante de pistacia (<i>Pistacia atlantica</i>)	27
1.1. Définition	27
1.2. Habitat et répartition géographique	27
1.3. Description botanique	28
1.4. Classification botanique	32
1.5. Composition chimique	33
1.6. Propriétés thérapeutiques de la <i>Pistacia atlantica</i>	33
1.7. Usages traditionnelles de la <i>Pistacia atlantica</i>	34
2. La plante de Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	35

2.1. Définition	35
2.2. Habitat et répartition géographique	35
2.3. Description botanique	36
2.4. Classification botanique	40
2.5. Composition chimique	40
2.6. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin	41
2.7. Utilisation	42
3. les huiles essentielles	42
3.1. Définition	42
3.2. Composition chimique des huiles essentielles	42
3.3. Les Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	44
3.4. Le rôle des huiles essentielles	45
3.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	45
3.5.1. Extraction par hydro distillation de l'huile essentielle	45
3.5.2. Expression a froids	46
3.5.3. Entrainement à la vapeur	46
3.5.4. Extraction par les solvants organiques	47
 Chapitre 04 : Matériel et méthode	
1. Objectif	48
2. Extraction des huiles essentielles	48
3. Echantillonnage	49
4. Dilution	50
4.1. Matériel	50
4.2. Réalisation de la dilution	50
5. Ensemencement	51
5.1. Matériel	51
5.2. Utilisations	51
5.3. Ensemencement en surface	51
5.3.1. Les milieux utilisés	51
5.3.1.1. Le milieu MRS (de Man-Rogosa-Sharpe)	
5.3.1.2. Le milieu King B	54
5.3.1.3. Le milieu King A	56
5.3.1.4. Le milieu Hektoen	57
5.3.1.5. Le milieu EMB	58
5.3.1.6. Le milieu SS (Salmonella Schegilla)	60
5.3.1.7. Le milieu GN (gélose nutritive)	61
5.4. Ensemencement en masse	63
6. Purification	64
6.1. Observation macroscopique	64
6.1.1. Test de catalase	68
6.1.2. Test de Citrat de Simmon	68
6.1.3. Test TSI/Gélose (triple sugar iron)	68
6.1.4. Test de clark et lubs	70
6.2. Observation microscopique	74
6.2.1. Coloration de gram	74
7. Activité antibactérienne	77
8. Discussion des résultats	80
Conclusion générale	81
Références bibliographiques	82

Table des matières

Liste des figures	84
Liste des tableaux	86
Liste des symboles	88
Liste des abréviations	88

Introduction générale

L'utilisation des plantes pour leurs vertus médicinales est une pratique très ancienne. Elle trouve ses origines dans les plus grandes civilisations de l'orient et de l'occident. Comme en témoignent les textes rédigés plusieurs millénaires avant notre époque, les sumériens, les égyptiens, les chinois et les indous, possédaient toute une panoplie de remèdes à base de plantes (**Tahire K. 2018**).

L'Algérie est un pays très riche en plantes qui poussent généralement à l'état spontané. Parmi ces plantes il y a la Romarin Officinal et la Pistacia atlantica qui sont souvent utilisées surtout chez les femmes et les nouveaux né.

L'objectif du présent travail est de projeter une étude sur ses deux plantes et leurs influences sur les femmes et les nouveaux nés afin de comprendre leurs rôles antibactériens.

Ce mémoire d'article autour des points suivants :

- Dans un premier temps, une présentation générale de la flore intestinale, les facteurs influençant, ses fonctions et son développement chez le nouveau né.
- Ensuite, un développement de différentes notions générales sur l'allaitement maternel, la composition du lait maternel, ces facteurs bioactifs, sa flore et l'importance de l'allaitement maternel pour le nourrisson et la mère.
- Une présentation générale des plantes Romarin officinal et la Pistacia atlantica y compris la description botanique, la composition chimique, les propriétés thérapeutiques, l'usage et les méthodes d'extraction de leurs huiles essentielles.

- Une projection sur les matériels et méthodes utilisée dans cette étude en passant par l'extraction des huiles essentielles, l'échantillonnage, la dilution, l'ensemencement, la purification jusqu'à l'activité antibactérienne.

Enfin, une conclusion générale qui portera une lecture attentive sur les différents résultats obtenus

1. Définition

Le mot microbiote (du grec mikros : petit et bios : vie) désigne les espèces microscopiques qui prédominent et/ou sont durablement adaptées à la surface et à l'intérieur d'un organisme vivant. Microbiote dérive de l'anglais microbiota et remplace aujourd'hui les termes désuets de flore microbienne ou de microflore.

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. Après la colonisation du tube digestif de la naissance à l'âge de 2 ans environ, le microbiote intestinal est propre à chaque individu et stable dans le temps. Par ailleurs, il existe un phénomène de résilience, c'est-à-dire le retour à l'équilibre après un événement perturbateur (comme la prise d'antibiotiques par exemple). Si la composition en termes d'espèces est propre à chaque individu, les caractéristiques sont très conservées en termes de composition au niveau des phyla et grands groupes phylogénétiques **(Belfatmi S et Souidi F, 2018)**.

Le microbiote intestinal est composé de 1014 micro-organismes réparti en 160 espèces bactériennes chez un individu donné parmi le millier d'espèces qui ont pu être identifiées dans différentes cohortes humaines. Ces bactéries sont réparties en 4 phyla bactériens : firmicutes, bacteroidetes, actinobacteria, et proteobacteria.

Les firmicutes et les bacteroidetes constituent les deux phyla dominants du microbiote avec une représentativité respective de 60–75 % et 30–40 %. Cette microflore représente 10 à 20 fois le nombre total de cellules du corps humain ce qui correspond à environ 2 à 4 millions de gènes si l'on considère le génome global **(Belfatmi S et Souidi F, 2018)**.

Les produits de ces gènes confèrent des capacités métaboliques non codées par le propre génome de l'hôte. La flore digestive possède de très nombreuses fonctions utiles à l'hôte. Elle participe à un certain nombre d'activités fonctionnelles et interfère avec la digestion et l'absorption de certains nutriments. Ce qui fait qu'elle est considérée par certains comme un « organe » caché **(Belfatmi S et Souidi F, 2018)**.

2. Les facteurs influençant la flore microbienne digestive

De nombreux facteurs vont influencer cette cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né. Parmi ces facteurs nous citons :

2.1. Les facteurs génétiques

La composition du microbiote serait déterminée dès le départ par notre génétique.

L'existence d'un effet des caractères génétiques de l'hôte sur la composition de son microbiote a été très tôt suggérée grâce à l'observation des jumeaux qui avaient une flore cultivable très semblable. Ainsi, l'impact des caractéristiques génétiques semble important, la composition de la flore étant plus similaire entre des jumeaux monozygotes (c'est à dire qui proviennent de la division d'un œuf fécondé unique) vivants dans les mêmes conditions et dans le même environnement, qu'entre des personnes partageant le même style de vie mais non apparentées ou génétiquement moins proches (fratrie, parent et enfant, couple). Le génotype déterminerait la susceptibilité de l'individu face à certaines familles de bactéries et favoriserait leur colonisation ou pas, mais il ne peut pas à lui seul conditionner les modifications de la composition de la flore (**Belfatmi S et Souidi F, 2018**).

2.2. L'environnement et les conditions d'hygiène

L'environnement peut influencer la colonisation intestinale. Dans les pays industrialisés, les nourrissons naissent et grandissent avec des normes hygiéniques élevées, alors que les nourrissons nés et élevés dans les pays en développement rencontrent des expositions bactériennes plus élevées, ce qui peut avoir des conséquences pour le processus de colonisation intestinale. Il est bien admis que la colonisation par des espèces commensales habituelles, comme *Escherichia coli*, est souvent retardée dans les pays industrialisés comparée aux pays en développement (**Belfatmi S et Souidi F, 2018**).

2.3. Antibiothérapie

L'administration orale d'antibiotiques (principalement l'amoxicilline) mais aussi d'antifongiques (le miconazole) à l'enfant pendant le premier mois de vie a montré une diminution du nombre de *Bifidobacterium* et de *Bacteroides fragilis*.

De plus, l'antibiothérapie chez la femme per partum (surtout pour la prévention du risque d'infection néonatale par le *Streptocoque* du groupe (B)) a montré une augmentation des

infections néo natales par des bactéries résistantes à l'antibiotique (Belfatmi S et Souidi F, 2018).

Au cours de l'allaitement, les antibiotiques sont administrés pour traiter une infection maternelle. Le choix des antibiotiques va se porter sur des molécules qui s'éliminent peu dans le lait et qui sont peu susceptibles d'entraîner des effets indésirables pour le nouveau-né. La plupart des antibiotiques passent dans le lait. Le plus souvent, les quantités auxquelles l'enfant est exposé sont faibles et le traitement antibiotique ne constitue pas une contre-indication à l'allaitement (Belfatmi S et Souidi F, 2018).

2.4. Mode d'accouchement

Une étude du département de biologie de Puerto Rico a montré que de la composition du méconium prélevé dans les premières 24 heures était déjà très différente entre un nouveau né accouché par césarienne ou par voie basse. Les enfants nés par voie basse présentaient une flore proche de la flore vaginale de leurs mères (*Lactobacillus*, *Prevotella*) alors que les enfants nés par césarienne présentaient une communauté bactérienne proche de celle de la peau (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*).

Chez le nouveau-né âgé d'un mois, la différence de composition est toujours importante, l'accouchement par césarienne est associé à une plus faible colonisation par des bifidobactéries et *Bacteroides fragilis* et à une plus forte colonisation par des *Clostridium difficile* (Belfatmi S et Souidi F, 2018).

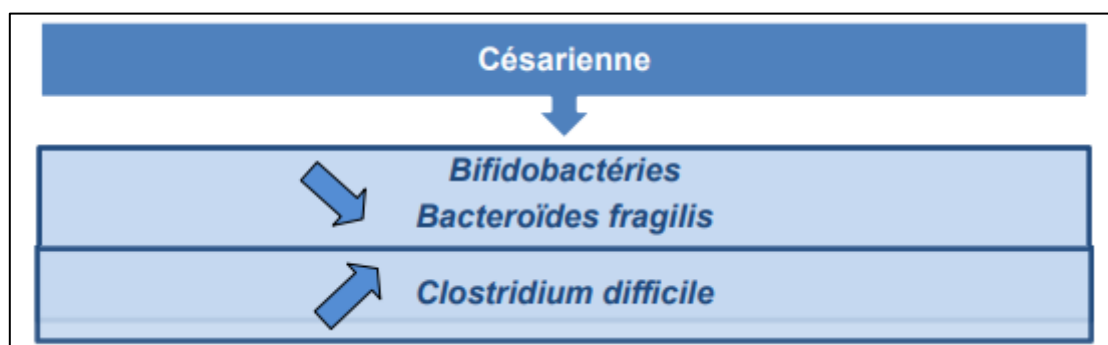


Fig. 01 : Influence de l'accouchement sur la composition du microbiote (Laure Frayssinhes, 2017).

2.5. Mode d'alimentation

La complexité de la composition du lait maternel favorise l'implantation des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Les bactéries comme *Clostridium* et *Bacteroides*, quant à elles, s'installent plus tardivement. Chez un enfant nourri au lait infantile, la flore sera plus diversifiée, incluant des *Bacteroides*, des clostridies et des entérobactéries (**Josephine Chevalier, 2018**).

En effet, bien que le lait maternel fût longtemps considéré comme stérile, nous savons aujourd'hui qu'il participe activement à l'élaboration de la flore microbienne post-natale grâce à son profil dynamique de nutriments et de composants bioactifs. Il se compose d'une part d'oligosaccharides qui agissent comme prébiotiques, et d'autre part d'un ensemble de bactéries formant une niche écologique qui lui est propre. Celle-ci comprend les *Lactobacillus* spp et les *Bifidobacterium* spp, qui seraient issues de l'intestin maternel, par le biais d'un cycle entéro-mammaire (**Josephine Chevalier, 2018**).

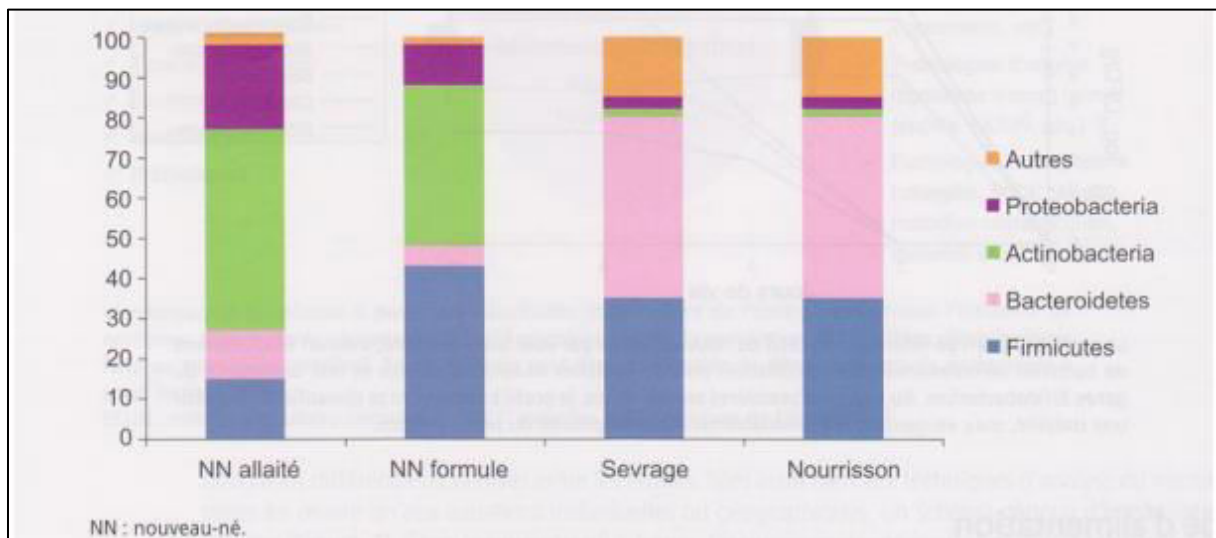


Fig. 02 : Evolution du microbiote intestinal au cours des deux premières années de vie (Josephine Chevalier, 2018).

3. Les fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un acteur à part entière de notre santé. En effet, les bactéries intestinales sont impliquées dans de nombreuses fonctions bénéfiques à l'hôte : fonctions nutritive et métabolique, protectrice et immunologique. La figure 03 ci-dessous représente les trois grandes fonctions du microbiote (Laure Frayssinhes, 2017).

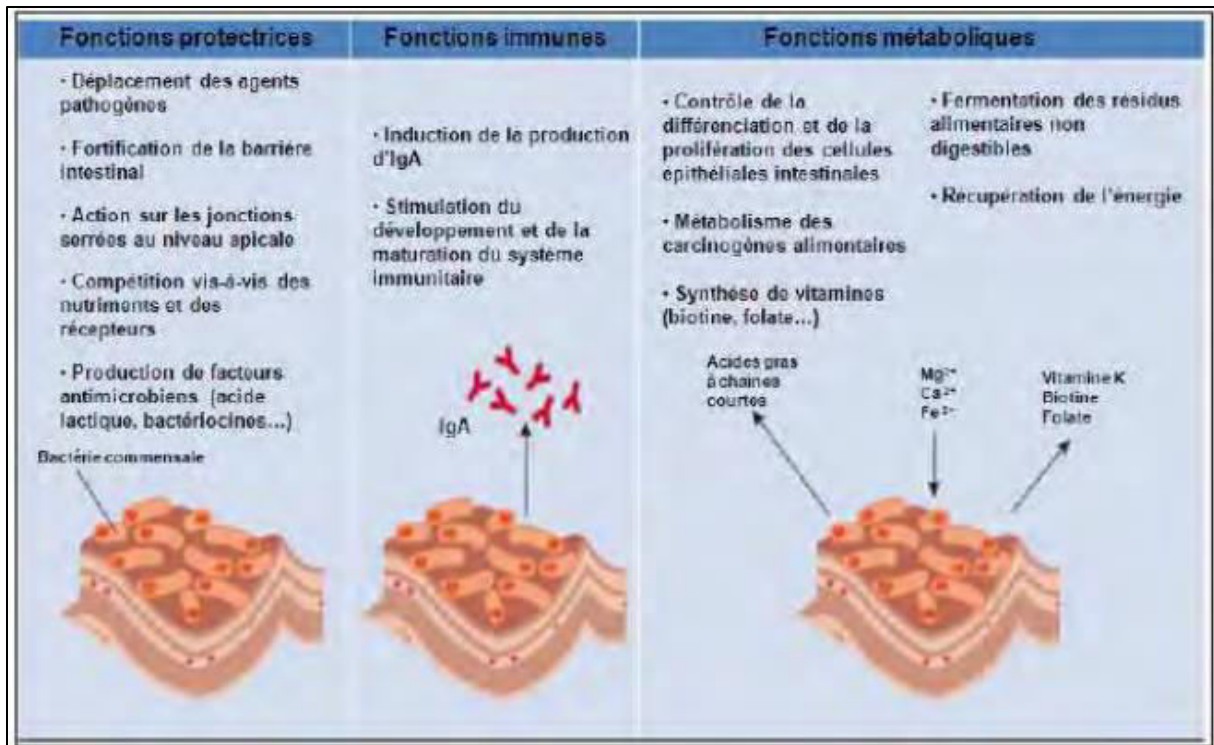


Fig. 03 : Fonction du microbiote intestinale (Laure Frayssinhes, 2017).

3.1. Fonction protectrice

3.1.1. Maintien de l'intégrité cellulaire

L'impact du microbiote intestinal sur la physiologie du système digestif a été mis en évidence sur des souris axéniques : le temps de transit gastro-intestinal était ralenti, le caecum très volumineux et la muqueuse intestinale moins développée. Les études réalisées sur les tissus ont confirmé que le renouvellement de l'épithélium était diminué. Le microbiote intestinal assure également le maintien de l'intégrité et le développement de la structure intestinale. En effet, les animaux axéniques présentent un épithélium intestinal immature, et le réseau sanguin qui l'irrigue est moins dense que chez l'animal normal. De plus, les produits de la fermentation microbienne constituent une énergie importante pour la croissance des cellules épithéliales. Les Bifidobactéries jouent un rôle important dans l'intégrité de la barrière

intestinale. Nous verrons plus loin qu'une diminution de ces bactéries entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale. A l'inverse, la colonisation de souris axéniques par un microbiote complexe permettait de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales ainsi que la production de mucus (**Laure Frayssinhes, 2017**).

3.1.2. Protection contre les bactéries pathogènes

Les bactéries du microbiote intestinal forment une barrière contre la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries exogènes pouvant être potentiellement pathogènes. Elles empêchent également le développement excessif de bactéries pathogènes faiblement représentées. Cette fonction protectrice est permise par deux mécanismes, d'une part il y a une compétition pour les nutriments et d'autre part une compétition pour l'occupation des sites d'adhérence épithéliaux, cela signifie que les bactéries commensales en étant plus nombreuses, vont utiliser les nutriments disponibles et occuper les emplacements disponibles en laissant que peu de nourriture et de place pour les pathogènes (**Laure Frayssinhes, 2017**).

Les bactéries du microbiote intestinal vont produire des composés antimicrobiens comme des bactériocines qui détruisent les bactéries pathogènes. La muqueuse intestinale est recouverte de mucus principalement constitué de mucines et contenant également des agents antibactériens comme le lysozyme, les immunoglobulines A sécrétées et les défensives produits par les cellules épithéliales. Le microbiote intestinal, en modulant l'expression des gènes des cellules épithéliales régule la composition du mucus (**Laure Frayssinhes, 2017**).

3.2. Fonctions métaboliques et nutritionnelles

Le microbiote intestinal est capable de récupérer l'énergie ingérée mais non digérée par l'hôte. Chez l'homme, la majorité des nutriments (environ 85% de glucides, 66% à 95% de protéines et toutes les graisses) sont absorbés avant d'entrer dans le gros intestin. Les hydrates de carbone non digestibles et les protéines que le côlon reçoit représentent de 10% à 30% de l'énergie ingérée totale et, sans l'activité de la flore microbienne colique, seraient généralement éliminés par les selles sans absorption supplémentaire car le gros intestin humain a une capacité digestive limitée.

La première mise en évidence du rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie énergétique est venue des travaux de Backhed et al. Ces études ont montré que les souris axéniques (exemptes de flore intestinale) présentaient un tissu adipeux 40% inférieur aux souris conventionnelles. De plus, les souris axéniques à la naissance, puis

colonisées par une flore intestinale émanant de souris normales, ont développée d'avantage de masse grasse (environ +60%) et présentaient une diminution de la sensibilité à l'insuline deux semaines après l'instauration de la flore (**Laure Frayssinhes, 2017**).

3.2.1. Métabolisme des glucides

Les glucides fermentescibles sont principalement constitués d'amidons résistants aux α -amylases de l'hôte, de polysaccharides végétaux (cellulose, hémicellulose et certaines pectines) ainsi que d'autres types de glucides (des édulcorants, des oligosides...). Le côlon reçoit environ 10 à 60 grammes par jour de glucides non digestibles selon les habitudes alimentaires. La dégradation des sucres complexes présents dans nos aliments s'effectue au niveau du côlon par l'intermédiaire d'une grande variété d'enzymes appelées carbohydate-active enzymes (CAZymes). On retrouve deux grandes familles, les glycoside-hydrolases (GH) et les polysaccharide-lyases (PL), ubiquitaires, qui catalysent la coupure des polysaccharides. En effet, le génome humain ne code que pour 8 à 17 GH qui présentent des capacités digestives limitées pour les sucres complexes. En comparaison, il a été estimé qu'un microbiote de 1 000 espèces peut produire environ 56 000 GH et PL ce qui permet aux bactéries d'assurer leur source de carbone en dégradant les substrats alimentaires non digérés.

La dégradation des polysaccharides nécessite donc la contribution de plusieurs espèces bactériennes, possédant un grand nombre d'activités enzymatiques différentes et complémentaires. Les principales espèces bactériennes pour lesquelles une activité hydrolytiques a été démontrée appartiennent aux genres Bacteroides, Bifidobacterium, Ruminococcus et Roseburia ainsi qu'aux Clostridium, Eubacterium, et Enterococcus (**Laure Frayssinhes, 2017**).

Dans la figure 04 on peut voir que les CAZymes d'origine humaine ne permettent la digestion que de seulement 0,03% des oses (essentiellement le lactose, saccharose et une partie de l'amidon) tandis que l'intervention des CAZymes bactériennes permettent la dégradation de 99,96% des polysaccharides restants (amidon, glycanes, glycoaminoglycanes, mucines et glycoprotéines) (**Laure Frayssinhes, 2017**).

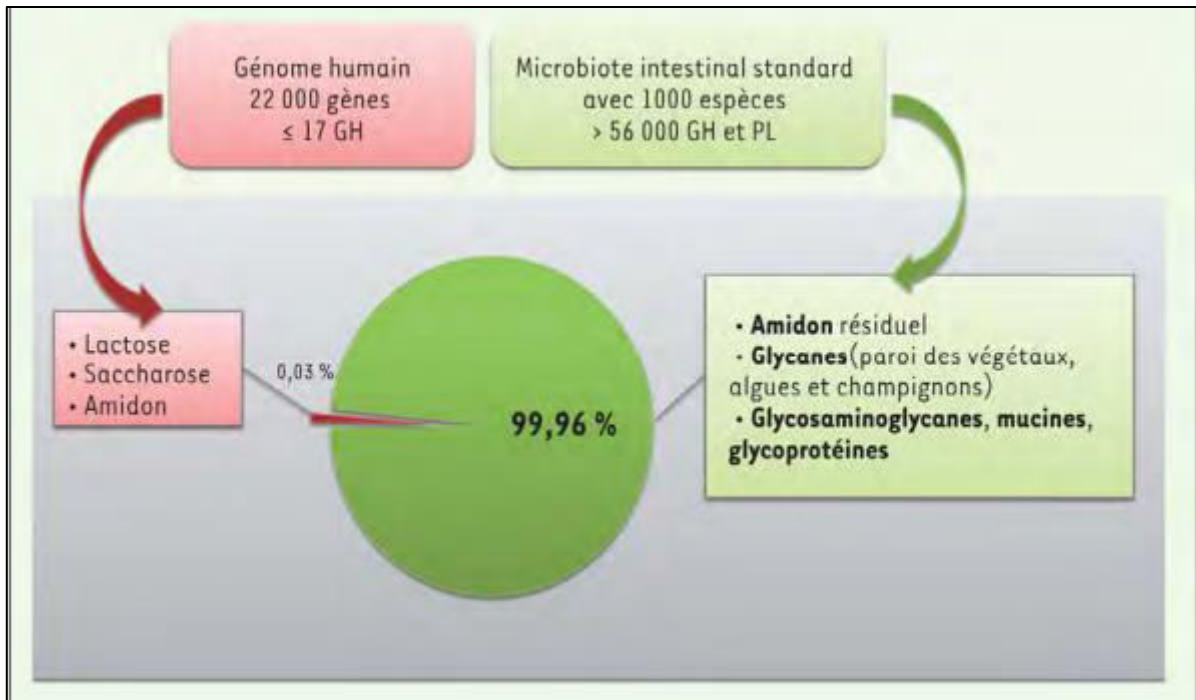


Fig. 04 : Potentiel digestif du microbiote humain (Laure Frayssinhes, 2017).

La digestion proprement dite consiste, d'abord, en une coupure par les enzymes bactériennes des polysaccharides en leurs sucres simples constitutifs, puis en la fermentation bactérienne de ces sucres simples en acides gras à courtes chaînes (AGCC), il y aura également production de gaz tels que le CO₂, le CH₄ et H₂. Les principaux AGCC produits sont l'acétate, le propionate, et le butyrate. Le type et la quantité d'AGCC et de gaz produit dans l'intestin dépendent de plusieurs facteurs, notamment l'âge, le régime alimentaire, surtout la disponibilité des glucides non digérés, la composition de la communauté intestinale microbienne, le temps de transit intestinal, le pH du côlon, et le segment du côlon. Cette digestion est représentée sur la figure ci-dessous (Laure Frayssinhes, 2017).

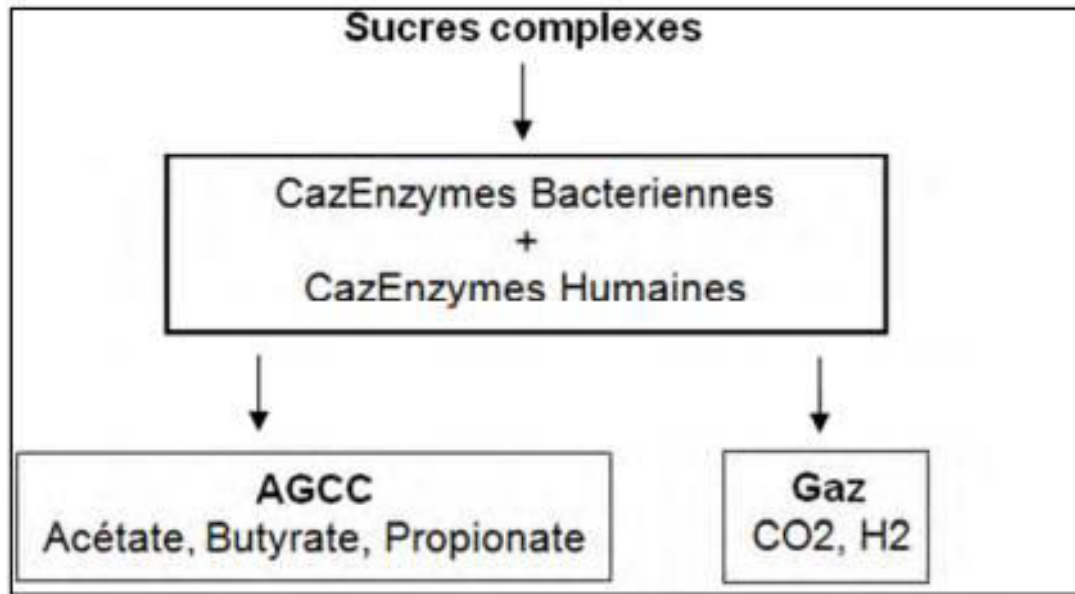


Fig. 05 : Schéma de la digestion des glucides : La dégradation des polysaccharides conduit à la formation de produits de fermentation bactérienne (Laure Frayssinhes, 2017).

Comme une grande partie de l'intestin est anaérobie, l'élimination du H₂ produit lors de la fermentation va interagir avec le microbiote. Le H₂ sera en partie éliminé par la respiration. Une partie est consommée par trois groupes de microorganismes : les méthanogènes, les acétogènes (homo-acétogènes) et les sulfates-réducteurs qui coexistent dans le côlon en proportion différentes. On notera que l'accumulation de H₂ dans le côlon inhibe la fermentation.

Parmi les acétogènes détectés dans l'intestin humain, beaucoup appartiennent au phylum des Firmicutes. L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure 06 ci-dessous (Laure Frayssinhes, 2017).

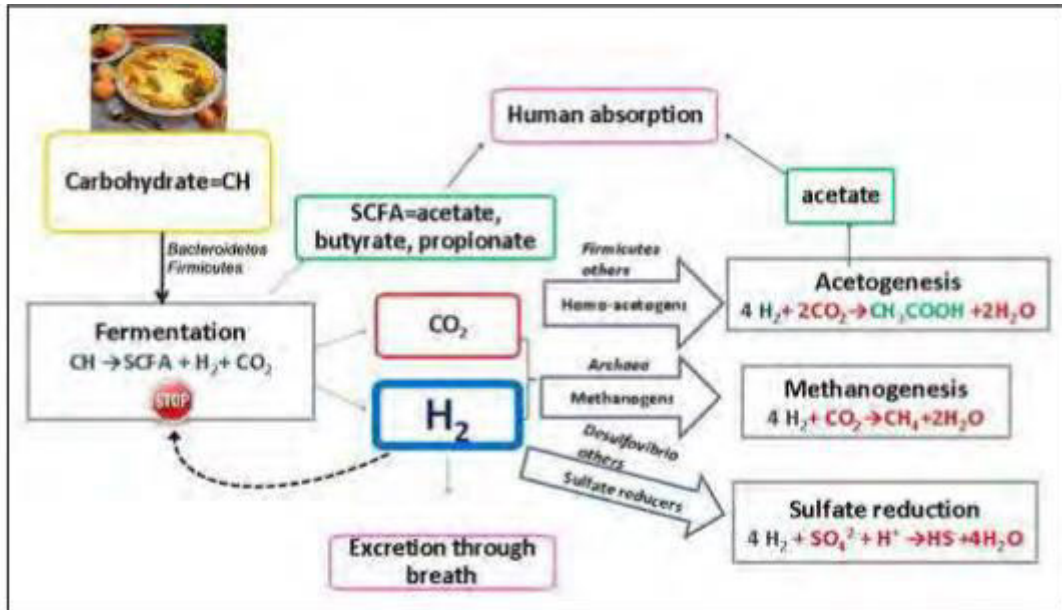


Fig. 06 : Produits issus de la fermentation (Laure Frayssinhes, 2017).

On peut voir les glucides (carbohydrates) qui sont fermentés, produisant des AGCC (SCFA en anglais) qui seront assimilés par l'intestin et des gaz (CO₂, H₂) qui seront à leur tour utilisés par les microorganismes pour conduire à la formation de l'acétate, du méthane et permettre la sulforéduction (Laure Frayssinhes, 2017).

3.2.2. Métabolisme des lipides

Les acides gras alimentaires sont majoritairement absorbés au niveau de l'intestin grêle, et par conséquent 5 à 8 grammes de lipides totaux par jour arrivent dans le côlon. De nombreuses espèces bactériennes possèdent des lipases et vont permettre d'hydrolyser les triglycérides à chaînes longues. Les acides gras subiront alors plusieurs modifications (hydrolyse, oxydation, réduction...) grâce aux bactéries du microbiote.

Par ailleurs, le microbiote est capable de métaboliser le cholestérol en coprostanol qui est éliminé via les fèces. Chez la majorité des individus, 70% du cholestérol est métabolisé par le microbiote, toutefois les bactéries responsables de ce métabolisme sont méconnues. En 2007, une étude a identifié le rôle d'une souche bactérienne proche de l'espèce *Bacteroides* dorei dans le métabolisme du cholestérol (Laure Frayssinhes, 2017).

3.2.3. Métabolisme des protéines

La dégradation des protéines dans le côlon fait intervenir de nombreuses espèces bactériennes possédant des activités enzymatiques complémentaires (protéases, désaminases, transaminases...). Certaines bactéries utilisent principalement les acides aminés comme source d'énergie, par exemple les genres *Clostridium*, *Acidaminococcus*, *Peptococcus*.

Les acides aminés sont majoritairement fermentés par désamination, cela va conduire à la production d'AGCC et d'ammoniaque. L'ammoniaque est un composé potentiellement toxique pour l'hôte, il est rapidement assimilé et métabolisé en urée par le foie puis excrété dans l'urine. Il pourrait être impliqué dans l'initiation du cancer colique (**Laure Frayssinhes, 2017**).

3.2.4. Métabolisme des gaz

L'hydrogène est le gaz le plus produit lors de la fermentation. La majeure partie est réutilisée par les espèces hydrogénotrophes, le reste étant excrétée par voie pulmonaire. Ces espèces hydrogénotrophes maintiennent une pression partielle en hydrogène faible afin de permettre une oxygénation complète des substrats (**Josephine Chevalier, 2018**).

3.3. 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.

Tout d'abord, le microbiote intestinal entre en compétition avec les pathogènes pour les nutriments et les récepteurs d'adhésion épithéliaux. Les bactéries commensales sécrètent également des bactériocines qui inhibent la croissance de souches bactériennes proches de la bactérie productrice. Ces bactériocines ont bien souvent un spectre d'action plutôt étroit. Le microbiote intestinal est capable de synthétiser des acides gras qui diminuent le pH local et empêchent la prolifération de certains pathogènes. Enfin, la transformation d'acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires par le microbiote peut rendre l'environnement hostile à la prolifération de certains pathogènes. Difficile qui ne peut se développer correctement en présence d'acide désoxycholique. Ces mécanismes de protection sont appelés « effets barrière directs ». Le microbiote intestinal utilise également plusieurs mécanismes indirects. Il participe au maintien de la couche de mucus présente au niveau du pôle apical des cellules

épithéliales de l'intestin. Les bactéries et leurs produits maintiennent une certaine distance avec les cellules de l'hôte en régulant la quantité de mucus produite en modulant les gènes codant pour les mucines.

D'autre part, la communication étroite entre les cellules épithéliales et les bactéries commensales aboutit à la production de peptides anti-microbiens par les cellules épithéliales, les entérocytes et les cellules de Paneth. Par ailleurs, la sécrétion d'IgA par les plasmocytes de la muqueuse intestinale limite le contact du pathogène avec la surface épithéliale et son entrée dans la muqueuse.

Enfin, le microbiote intestinal influence la réparation épithéliale, et impacte l'expression des gènes codant pour les protéines formant les jonctions serrées des cellules épithéliales et participe à cet effet barrière indirect (**Josephine Chevalier, 2018**).

3.4. Microbiote intestinal et système immunitaire

Outre ses propriétés de barrière, le microbiote intestinal impacte fondamentalement le système immunitaire. Cette découverte vient de l'observation de déficits immunitaires majeurs chez des animaux axéniques, c'est-à-dire nés et élevés stérilement. Dans ce type d'expérience, les souris axéniques présentent de nombreuses anomalies du système immunitaire intestinal: hypoplasie des plaques de Peyer, diminution du nombre de lymphocytes dans la lamina propria, moins de plasmocytes dans les centres germinatifs, population de lymphocytes T diminuée, réduction de la sécrétion intestinale d'IgA, diminution des taux d'immunoglobines sériques et de production de cytokines. Ces anomalies disparaissent lorsqu'on leur inocule le microbiote de souris Wild Type. Le bon fonctionnement de l'immunité réside dans la collaboration étroite entre les bactéries du microbiote intestinal et les cellules immunitaires. Lorsqu'un antigène arrive à la muqueuse intestinale, il est capté par des récepteurs TLR présents à la surface des cellules épithéliales. Certaines bactéries sont capables d'empêcher cette interaction par la production de mucus. La barrière physico chimique constitue donc un premier niveau de protection, tandis que les immunités innée et acquise agissent à un second niveau.

Le microbiote intestinal régule le nombre de cellules dendritiques locales, et stimule le développement de macrophages et monocytes. Les acides gras à chaîne courte comme le butyrate inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires, tandis que l'acétate joue un rôle dans le recrutement de neutrophiles. L'interaction entre les bactéries commensales et les

cellules dendritiques amène à la production d'IgA par les lymphocytes B, limitant la pénétration de pathogènes dans la muqueuse intestinale.

La population de lymphocytes T CD8+ dans l'espace intra-épithélial se maintient grâce aux signaux émis par le microbiote intestinal. De même, le maintien de la population de lymphocytes T régulateurs, ou Treg, est dû en parti au microbiote. Si certaines bactéries stimulent les populations Th17 intestinales, d'autres agissent sur les Treg.

Par ces multiples interactions, on constate que le microbiote intestinal joue un rôle majeur sur l'homéostasie du système immunitaire, et inversement (**Josephine Chevalier, 2018**).

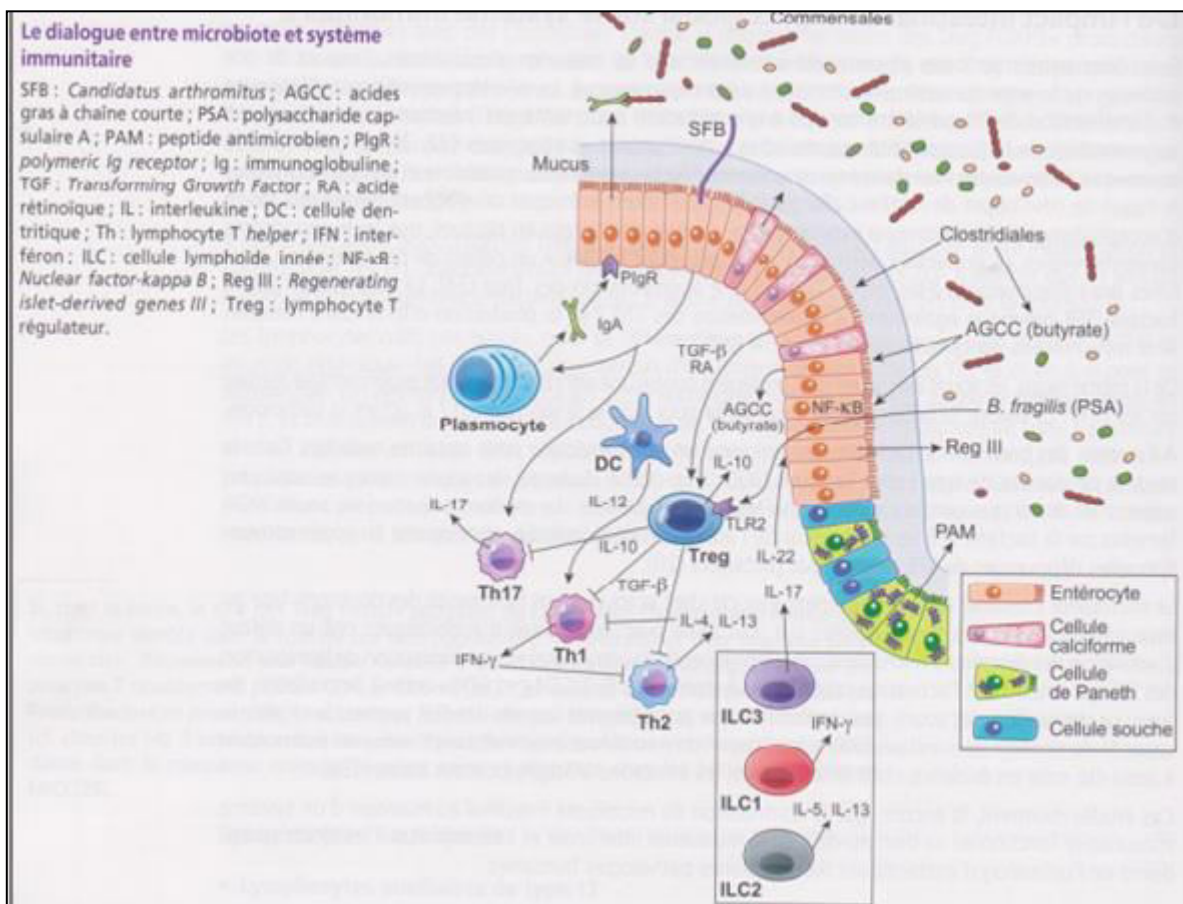


Fig. 07 : dialogue entre microbiote et système immunitaire (Josephine Chevalier, 2018).

4. Le développement de la flore intestinale chez le nouveau-né

4.1. La période prénatale

Auparavant, les chercheurs considéraient que le placenta est stérile au cours d'une grossesse normale et que le fœtus vit dans un état axénique physiologique. Où la présence de bactéries dans les cultures cliniques est un diagnostic pour une infection intra-utérine et un risque important d'accouchement prématuré.

Peu d'études ont examiné le microbiote utérin chez les femmes saines ayant des naissances à terme. En effet, la présence de bactéries a été détectée, dans le liquide amniotique et les membranes fœtales de bébés indemnes de toute inflammation. Ces études ont révélé une communauté complexe à faible abondance dominée par les phylas Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes et Fusobacteria (**Belfatmi S et Souidi F, 2018**).

Il a été constaté que microbiome placentaire ressemble le plus au microbiome oral que celui du vagin et des selles. Cela implique que l'origine des bactéries placentaire n'est probablement pas ascendante ni issue d'une contamination fécale ou vaginale mais plutôt de la cavité orale par propagation hématogène (**Belfatmi S et Souidi F, 2018**).

4.2. La période postnatale

Après la naissance, le bébé est exposé chaque jour à de nombreuses espèces bactériennes, que ce soit dans son environnement ou dans son alimentation. Dès les premières heures de vie, une flore bactérienne dite "normale", physiologique ou saprophyte s'installe : le Streptocoque alpha-hémolytique prédomine au niveau de la gorge; le Staphylocoque blanc au niveau de la peau, du rhinopharynx et de l'ombilic (**Belfatmi S et Souidi F, 2018**).

La flore bactérienne digestive est cependant plus complexe ; elle atteint à partir de la 48^{ème} heure de vie des taux de 10^8 à 10^{10} micro-organismes par gramme de fèces, chiffres proches de ceux observés chez l'adulte. Les premiers colonisateurs de l'intestin sont les bactéries anaérobies facultatives (telles que: *Escherichia coli*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Enterococcus sp* et *Lactobacillus sp*). Ces bactéries consomment l'oxygène de la lumière intestinale afin de créer les conditions les plus favorables pour le développement des bactéries anaérobies strictes. Après une semaine de vie, les genres anaérobies strictes, tels que : les Bifidobactéries, les Bactéroïdes et Clostridium sont détectés dans les selles des

nourrissons. Une flore complexe et stable, proche de celle de l'adulte, semble obtenue entre l'âge de 2 à 4 ans. Le processus de colonisation microbienne est dynamique et conduit à la formation d'un microbiote intestinal spécifique à l'hôte (Belfatmi S et Souidi F, 2018).

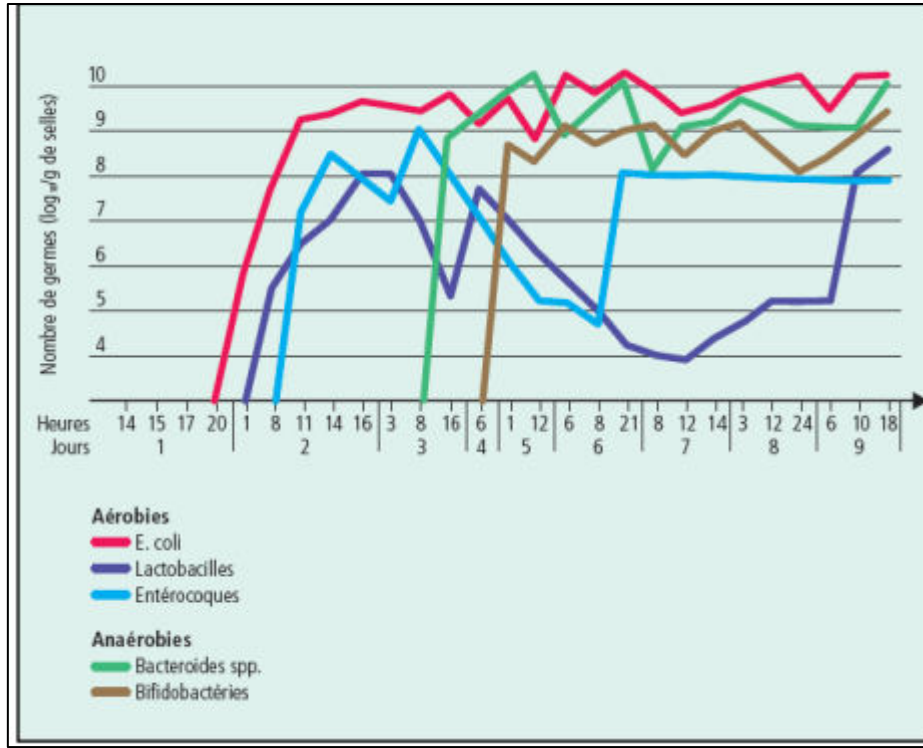


Fig. 08: Colonisation naturelle de l'intestin d'un nouveau-né au cours des dix premiers jours de vie (Belfatmi S et Souidi F, 2018).

1. Définition du lait

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum ».

Le lait maternel, ce n'est pas qu'un aliment. Ce n'est pas que l'addition de lipides, de glucides, de protides, de vitamines, d'oligo-éléments destinés à faire grandir et grossir les petits humains, mais il est parfaitement adaptés à leur métabolisme. Le lait maternel, c'est aussi plein de facteurs de protection : anticorps, lactoferrine, lysozyme, caséine, fibronectine, protectine, protéines du complément, lymphocytes, cytokines, enzymes comme la catalase, oligosaccharides, etc... (**Abbassa Amira et Moussa Imane .2018**).

2. Le lait maternel

Le lait humain, comme celui de tous les mammifères, est propre à l'espèce. Il contient tous les éléments nécessaires pour assurer la croissance et le développement du nourrisson. Contrairement aux préparations commerciales, la composition du lait maternel varie dans le temps, en fonction du déroulement de la tétée, au cours de la journée, et sur la période d'allaitement (**Beaudry et al, 2006**).

Le premier lait (le colostrum) est un liquide jaunâtre qui évolue vers le lait mature au bout de quelques jours. Il est sécrété dès le 5ème mois de grossesse. Ce liquide est très riche en protéines et en anticorps, ce qui en fait un aliment de choix, tout à fait adapté aux besoins du bébé pendant les 48 à 72 heures qui suivent sa naissance (**Rigourd et al, 2011**).

2.1. La composition du lait maternel

La composition du lait maternel évolue au cours de la lactation.

2.1.1. Le colostrum

Il est produit durant les 3 à 5 premiers jours de lactation. Moins riche en lipides et en lactose que le lait mature, il a une plus faible valeur calorique mais il contient deux fois plus de protéines, surtout des immunoglobulines A (IgA), des facteurs de croissance et des cytokines. Il est également riche en cellules immunitaires et en oligosaccharides.

2.1.2. Le lait de transition

Il est produit au cours des 15 jours suivants. Sa composition évolue vers celle du lait mature avec une augmentation progressive de la teneur en lipides et en lactose et une diminution de la teneur en protéines.

2.1.3. Le lait mature

Il est produit environ trois semaines à un mois après le démarrage de l'allaitement et donne une Energie de 67 kcal/100 ml pour (M. Tackoen, 2012).

Pour 100 ml	Lait maternel mature
Calories (Kcal)	67
Protéines (g)	1
Caséine (%)	30%
a-lactalbumine (g)	0,32
b-lactoglobuline (g)	0
Immunoglobulines (g)	0,15
Lipides (g)	3,5
Triglycérides (%)	98
Cholestérol (%)	0,5 (20 mg/dl)
Phospholipides (%)	0,7
Ac. linoléique (mg)	350 (10%)
Ac. linoléique (mg)	37 (1%)
DHA (%)	0,2 à 1,2
AA (%)	0,5
Carbohydrates (g)	7,5
Lactose (%)	85 (7,5 g/dl)
Dextrine-maltose (g)	0
Autres sucres	Oligosaccharides (1,3 g/dl)
Sels minéraux (mg)	210
Sodium (mg)	16
Calcium (mg)	25
Phosphore (mg)	13
Fer (mg)	0,05

Tableau 01 : Teneurs indicatives en énergie, protéines, lipides, carbohydrates et minéraux du lait de femme (M. Tackoen, 2012).

2.1.4. Eau qui représente 88 % du lait maternel.

2.1.5. Substances azotées

2.1.5.1. Protéines

La teneur en protéines du lait maternel est faible, entre 0,8 et 1,2 g/dl. On distingue les protéines solubles ou lactosérum (70 %) et les protéines insolubles ou caséines (30 %). La principale protéine du lait maternel avec un rôle nutritionnel est la lactalbumine. Les caséines forment des micelles beaucoup plus petites. Il s'agit surtout de caséine β dont l'hydrolyse conduit à des peptides à propriétés opioïdes (caséomorphines) et à de la caséine κ hautement glycosylée, dont la fraction C terminale a des effets bifidogènes. Le pourcentage élevé de protéines liposolubles et les micelles de caséine de petite taille expliquent que le lait maternel est plus digeste. Le profil des acides aminés du lait maternel est en adéquation parfaite avec les besoins du nourrisson. Il a des teneurs plus faibles en acides aminés potentiellement délétères pour le développement cérébral à concentration élevée (phenylalanine, tyrosine, methionine) et des teneurs plus élevées en glutathion (antioxydant et transporteur de sélénium) et en taurine. La taurine est un neurotransmetteur mais est aussi présente dans la structure des acides biliaires. Elle intervient dans le développement cérébral et la conjugaison de la bile (M. Tackoen, 2012).

2.1.5.2. Composés azotés non protéiques

Ils représentent 20 % de l'azote. Il y a plus de 200 composés azotés non protéiques dans le lait maternel. Parmi eux, les nucléotides, qui ont plusieurs fonctions protectrices (M. Tackoen, 2012)

Protéines		Non protéiques
Solubles	Insolubles	
a-Lactalbumine b-Lactoglobuline Lactoferrine Lysozyme Albumine Immunoglobulines Hormones Facteurs de croissances Enzymes	Caséine a Caséine b Caséine k Caséine g	Créatine Créatinine Glucosamine Acides nucléiques Nucléotides Polyamines Urée Acide urique

Tableau 02 : Composés azotés du lait maternel (M. Tackoen, 2012).

2.1.6. Lipides

Les lipides sont la première source d'énergie du lait maternel ; ils fournissent 50 % des calories. La fraction lipidique du lait maternel est quantitativement la plus variable.

Les lipides sont organisés en globules microscopiques, ce qui facilite leur digestion et Absorption.

Le lait maternel est unique dans sa composition en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC), comme l'acide arachidonique (AA, 20:4 w-6) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6 w-3), qui sont dérivés des acides gras essentiels, acide linoléique (18:2 w-6) et acide α -linoléique (18:3 w-3) (M. Tackoen, 2012).

2.1.7. Carbohydrates

2.1.7.1. Le lactose

C'est la deuxième source d'énergie du lait maternel ; il fournit 40 % des calories du lait maternel. Commun au lait de tous les mammifères, c'est un nutriment spécifique de la première année, la lactase étant présente seulement chez les jeunes mammifères. Il favorise l'absorption de calcium et de fer. Il favorise également la colonisation des intestins par le *Lactobacillus bifidus*.

2.1.7.2. Oligosaccharides

Le lait maternel contient un nombre extraordinaire d'oligosaccharides (environ 130 différents) alors que le lait de vache en contient très peu. Ces oligosaccharides ne sont pratiquement pas absorbés au niveau intestinal et arrivent intacts dans le colon où ils facilitent la croissance des bifidobactéries.

La fermentation des oligosaccharides par les bactéries coliques produit des acides gras à courte chaîne, source d'énergie pour l'organisme (M. Tackoen, 2012).

2.1.8. Minéraux

Les quantités de minéraux présents dans le lait maternel sont adaptées aux possibilités d'élimination rénale.

Minéraux du lait maternel	
Calcium	280 mg/l
Phosphore	140 mg/l
Magnésium	35 mg/l
Chlore	420 mg/l
Potassium	525 mg/l
Sodium	161 mg/l
Cuivre	250 µg/l
Fer	300 µg/l
Iode	110 µg/l
Zinc	1.200 µg/l
Manganèse	6 µg/l
Sélénium	20 µg/l

Tableau 03: minéraux du lait maternel (M. Tackoen, 2012).

2.1.9. Vitamines

La composition en vitamines du lait maternel dépend du statut maternel en vitamines ou de ses apports alimentaires.

Le lait maternel contient peu de vitamine K. Combiné au transfert placentaire faible, à la faible production par un foie immature et à l'absence de flore intestinale produisant de la vitamine K, le risque de déficit néonatal existe et la maladie hémorragique du nouveau-né doit être prévenue par des suppléments d'apports.

Le taux de vitamine D du lait maternel est également insuffisant et nécessite des suppléments chez les nouveau-nés allaités exclusivement (**M. Tackoen, 2012**).

Vitamines du lait maternel	
A	670 mg/l
B1	210 mg/l
B2	350 mg/l
PP	1.500 mg/l
B5	1.800 mg/l
B6	93.000 mg/l
B8	4 mg/l
B9	85 mg/l
B12	0,97 mg/l
C	40.000 mg/l
D	0,55 mg/l
E	2.300 mg/l
K	2,1 mg/l

Tableau 04 : Vitamines du lait maternel (M. Tackoen, 2012).

3. Les facteurs bioactifs du lait maternel

Le nouveau-né naît avec un système immunitaire adaptatif naïf et un système immunitaire intestinal inné encore immature. Ce dernier est composé d'une barrière physique (l'épithélium intestinal avec des jonctions serrées entre les entérocytes et une couche de mucus), d'une barrière chimique (le pH relativement bas et les sécrétions du tube digestif, comme les défensines et le lysozyme) ainsi que du système immunitaire muqueux du tube digestif (les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques). Par ailleurs, le tube digestif du nouveau-né est stérile à la naissance.

Cette période est immédiatement suivie par une colonisation microbienne, de bactéries commensales et d'autres potentiellement pathogènes. La discrimination entre bactéries pathogènes et non pathogènes implique une immunomodulation qui se développe en période périnatale.

Les nouveau-nés nécessitent une protection contre les agents pathogènes mais aussi une source exogène d'immunomodulation.

Le lait maternel contient un ensemble impressionnant de facteurs bioactifs qui font de lui la source la plus riche de protection et d'immunomodulation. Le thymus des enfants allaités est d'ailleurs deux fois plus large que celui de ceux qui reçoivent du lait artificiel et une relation

dose-réponse entre la taille du thymus et la quantité de lait maternel reçue observée. Ces composants immunomodulateurs favorisent une réponse immunitaire optimale de la muqueuse, qui pourrait conditionner la réponse ultérieure du système immunitaire systémique (M. Tackoen, 2012).

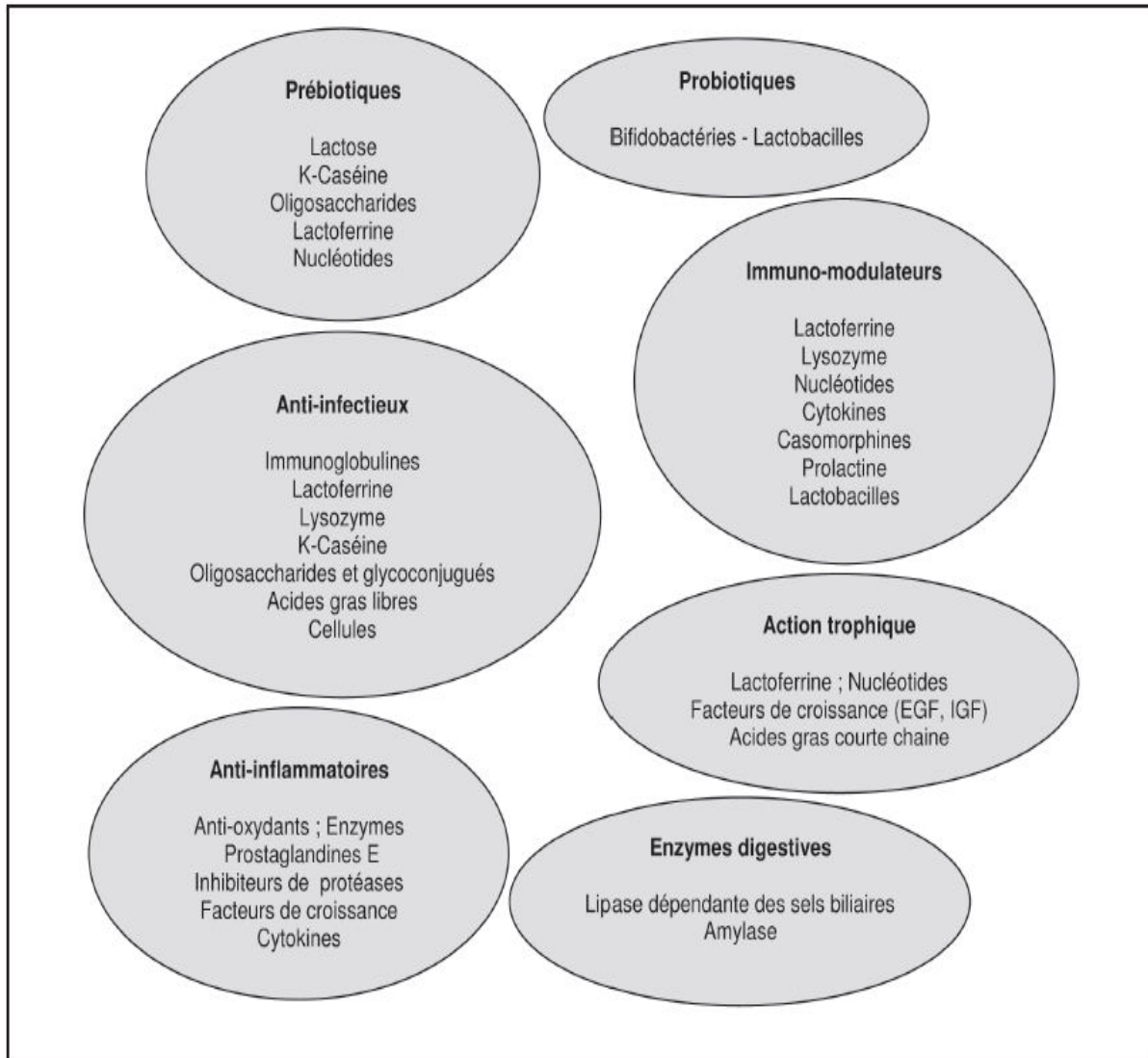


Fig. 01: Composants protecteurs du lait maternel.

4. La flore du lait maternel

Comme tout produit fait dans le corps, le lait maternel était traditionnellement considéré comme stérile. Au cours du temps, de nombreuses études ont permis de montrer que des bactéries étaient présentes dans le lait maternel. Il a été estimé qu'un nouveau-né consommant environ 800 ml de lait maternel par jour ingère environ 10⁵ à 10⁷ de bactéries, ce qui représente une source potentielle de bactéries commensales pour la colonisation de l'intestin du nouveau-né (**Martin et al, 2003; Scholtens et al, 2012**).

Jusqu'ici, on pouvait identifier deux à dix-huit souches bactériennes différentes par individu, notamment *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les espèces les plus souvent isolées dans le lait maternel sont *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus*, *Strep. mitis*, *Strep. salivarius*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *B. breve* et *B. bifidum*. Des études récentes sont parvenues à mettre en lumière jusqu'à 700 espèces différentes de bactéries (**Jeurink et al, 2013**).

Grâce aux nouvelles méthodes d'analyse, il est désormais possible d'établir une image plus claire de la composition bactérienne du lait maternel (**Hamosh, 2001**). Il est aujourd'hui admis que la composition bactérienne se modifie tout au long de la lactation, mais qu'il existe un microbiote de base qui reste constant, à l'image de la colonisation bactérienne dans d'autres régions de l'organisme. En outre, il semble que la composition microbienne du lait maternel soit vraiment propre à chaque femme et influencée par son état de santé et son poids, ainsi que par le mode d'accouchement (**Fernandez et al, 2013**).

Au cours des dernières années, certaines études ont montré que les bactéries du lait humain peuvent jouer plusieurs rôles dans l'intestin du nourrisson. Tout d'abord, elles peuvent contribuer à la réduction de l'incidence et de la sévérité des infections chez le nourrisson allaité par différents mécanismes tels que l'exclusion compétitive, la production de composés antimicrobiens ou l'amélioration de la fonction de barrière intestinale en augmentant la production de mucine et en réduisant la perméabilité intestinale (**Olivares et al, 2006**).

Enfin, les bactéries du lait humain ont un potentiel remarquable pour jouer des rôles métaboliques chez le nourrisson. Certaines lactobacilles et bifidobactéries, peuvent aider à créer un microbiote spécifique «sain» dans l'intestin du nourrisson (**Ward et al, 2006; Zivkovic et al, 2011**).

5. Importance de l'allaitement pour le nourrisson et la mère

5.1. Maladies infectieuses

Pour le nourrisson, le mode d'alimentation a des effets clairs sur plusieurs maladies. L'allaitement maternel réduit le risque des maladies infectieuses. Les pathologies infectieuses les plus étudiées pour lesquelles l'allaitement a un effet protecteur sont les suivantes : maladies gastro-intestinales, infections des voies urinaires, infections des voies respiratoires, dont les otites, méningites et entérocolites nécrosantes. Pour cette dernière, elle est la maladie intestinale grave la plus souvent rencontrée dans les unités de soins intensifs. Les études les plus récentes montrent que les prématurés allaités en sont dix fois moins atteints que ceux étant exclusivement nourris au lait de substitution. L'effet protecteur du lait contre les infections est dû aux cellules immunitaires, aux immunoglobulines et à certaines protéines et vitamines présentes dans le lait maternel (**Adrien BRUNO .2013**).

5.2. Maladies chroniques

Plus récemment, l'effet protecteur du lait maternel a été démontré sur certaines maladies chroniques tel que le l'obésité, les maladies atopiques (allergies), l'asthme, le diabète de type I et même certains cancers dans l'enfance. L'allaitement est aussi associé négativement à la pression artérielle et au taux de cholestérol. Cependant, les effets bénéfiques sont modérés et le nombre d'études est encore trop faible pour pouvoir avancer des conclusions significatives. De plus, le fait que certains effets démontrés par les méta-analyses, notamment sur la pression artérielle ou l'obésité, puissent résulter d'un biais de publication n'est pas à exclure (**Adrien BRUNO .2013**).

5.3. Effets cognitifs

Plusieurs études décrivent qu'une absence d'allaitement maternel équivaut à une baisse du quotient intellectuel. Cependant, un certain nombre d'autres études concluent qu'il n'y a pas d'association significative entre l'allaitement et le quotient intellectuel. Il n'y donc aucun consensus sur cette synergie. Ces effets de l'allaitement d'ordre cognitif sont dose-dépendants et seraient liés à la composition du lait maternel en acides gras. Une étude de cohorte récente de plus de 8000 enfants a démontré une association significative entre l'allaitement et les résultats scolaires des enfants à neuf ans. Cependant, ces effets sont à relativiser, car la différence des résultats scolaires varie entre 2 et 4% entre des enfants allaités exclusivement et ceux uniquement alimentés au lait de substitution. De plus, qui dit association ne dit pas

forcement relation de cause à effet, seule une étude randomisée pourrait montrer une causalité
(Adrien Bruno. 2013)

5.4. Bénéfices pour la mère

L'allaitement est aussi profitable pour la femme à court terme. L'allaitement favoriserait une perte de poids graduelle après la grossesse. Le poids initial serait plus rapidement retrouvé dans la plupart des cas. Cependant, il n'y a pas d'influence sur le taux d'obésité à long terme. Un allaitement exclusif empêche aussi le retour des règles par un mécanisme hormonal. Ainsi, durant les six premiers mois, cette aménorrhée a un effet contraceptif permettant d'éviter les grossesses rapprochées qui peuvent être la cause de pathologies obstétricales. L'aménorrhée permet aussi de réduire le risque d'anémie ferriprive postpartum, maladie qui est aussi moins fréquente en cas de mise au sein rapide après l'accouchement (moins de 30 minutes), car l'ocytocine sécrétée permet de réduire le risque d'hémorragie du post-partum. L'allaitement a aussi un effet protecteur à plus long terme sur l'hyperlipidémie, le diabète, l'hypertension artérielle, les maladies cardio-vasculaires, le cancer du sein et le cancer des ovaires (Adrien BRUNO .2013)

1. La plante de Pistacia (*Pistacia atlantica*)

1.1. Définition

Pistacia atlantica est originaire d'Asie Centrale. Présent en Turquie depuis 7000 ans avant J. C., il a été introduit en Italie dès le premier siècle avant J. C. et par la suite, sa culture s'est étendue aux autres pays méditerranéens et aux USA en 1854. Le pistachier de l'atlas est appelé en arabe local betoum, betouma, botma ou encore boutmaia (en Afrique du nord) et boutmela au Proche-Orient, iggh en berbère. le nom commun de cette espèce se rapporte aux montagnes d'atlas ou cette espèce se développe à été décrit pour la première fois par desfontaine en 1789, c'est une essence très ancienne (Assla A & Boucetta H.2018).

1.2. Habitat et répartition géographique

Cette espèce est commune dans deux régions de la méditerranée et de l'irano-touranie. Cependant, la qualifie d'endémique de l'Afrique du nord. Cette espèce forestière, dite de resquillage, s'accommode à tous les sols, excepté du sable. Elle se contente d'une faible pluviométrie de l'ordre de 150 mm et par fois moins. Elle est essentiellement un arbre de l'étage bioclimatique aride et accessoirement de l'étage semi-aride, il s'étend depuis les îles Canaries à l'ouest jusqu'au proche Orient vers l'est. En Algérie, on les trouve à l'état de groupement isolés d'Oran et Ain Sefra à l'ouest jusqu'à la Tunisie à l'est. Il est présent aussi dans l'Atlas saharien.

Dans le secteur du Sahara septentrional et dans le Hoggar, il est associé dans le proche orient à *Quercus Ithaburensis* et en Afrique du Nord à *Ziziphus lotus*. Elle se régénère et pousse toujours à l'intérieur du *Ziziphus lotus* qui constituerait une bonne protection aux jeunes pousses contre les vents et le pâturage. En plus de cela, le sol où les feuilles du *Ziziphus lotus* tombent deviendrait acide et faciliterait la germination des graines (Figure 1).

Il occupe une aire très vaste englobant le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, la Syrie, la Jordanie, Palestine, l'Iran et l'Afghanistan (Assla A & Boucetta H.2018).



Fig. 01: Nouveau plant à l'intérieur de Zizuphus lotus (Assla A & Boucetta H.2018).

1.3. Description botanique

Le genre *Pistacia atlantica* de la famille des Anacardiaceae, peut être classé en quatre sous-espèces, à savoir *mutica*, *cabulica*, *kurdica* et *atlantica*. Très répandues dans la région Méditerranéenne et Moyen-Orientale.

1.3.1. L'arbre

Le *Pistacia atlantica* est un arbre de 12 à 15 m de haut, à la cime ample et touffue. Le tronc est court avec un diamètre dépasser 1 m. Sa croissance est très rapide et sa longévité est d plusieurs siècles. C'est une espèce xérophile, possédant un système racinaire pivotant qui peut descendre jusqu'à 5 m de profondeur.

L'écorce de l'arbre est d'abord rouge, puis grisâtre assez claire avant de devenir un rhytidome dur et crevassé, tessellé en profondeur, disposé en damier et noirâtre comme celui du frêne oxyphylle c'est un arbre résineux. Le suintement du tronc d'arbre donnant un encre rouge utilisé dans la tannerie des peaux (Assla A & Boucetta H.2018).

1.3.2. Les feuilles

Elles sont composées, stipulées, à rachis finement ailé et à folioles lancéolées obtuses au sommet. Les feuilles sont caduques et chutent en automne, elles sont de couleur vert pâle et sont imparipennées, glabres et sessiles.



Fig. 02: Les feuilles du pistachier de l'Atlas (Mehdeb Djamila.2011).

1.3.3. L'inflorescence

Le Pistachier de l'Atlas a une inflorescence en grappe rameuse. La floraison qui apparaît juste avant la feuillaison débute la mi-mars.



Fig. 03: L'inflorescence du pistachier de l'Atlas (Assla A & Boucetta H.2018).

1.3.4. Les fleurs

Les fleurs mâles et femelles sont portées par des pieds différents. Mais quelques pieds monoïques ont été observés dont les fleurs mâles et femelles sont portées par des rameaux différents. Aucun hermaphrodisme n'a été observé. Les fleurs sont petites en panicules axillaires et sont apétales. Ce sont des fleurs régulières avec une tendance à la zygomorphie (Djenidi Habiba.2012).

1.3.4.1. La fleur mâle

Le calice possède quatre sépales. A l'aisselle du calice, il se trouve une bractée glabrescente, allongée, de grande taille par rapport aux fleurs et de couleur jaune pâle.

A l'aisselle de chaque bractée, 5 étamines se développent, de couleur rouge pourpre, et avec des filets courts et soudés à la base. Après la libération des grains de pollen au mois de mars, les fleurs mâles s'épanouissent et les étamines prennent une structure pétaloïde (Djenidi Habiba.2012).



Fig. 04: Les fleurs males du pistachier de l'Atlas (Mehdeb Djamila.2011)

1.3.4.2. La fleur femelle

Le calice a neuf sépales enchevêtrés entre eux et soudés à la base. Les sépales sont de taille variable selon les provenances. A l'aisselle du calice, il se trouve une bractée semblable à celle de la fleur mâle. Le gynécée présente trois carpelles concrescents avec une seule loge ovarienne fertile et un seul ovule pendant. Le style porte trois stigmates rugueux facilitant la fixation des grains de pollen (**Djenidi Habiba.2012**).



Fig. 05: Les fleurs femelles du pistachier de l'Atlas (Mehdeb Djamila.2011).

1.3.5. Les fruits :

Les fruits gros comme un pois sont appelés ELkhodiri par les populations locales en raison de la prédominance de la couleur verte foncée à la maturité, ce sont des drupes (ne dépassant pas le centimètre) légèrement ovales quelque fois allongés à épiderme qui se ride en séchant sur un endocarpe induré mais très mince abritant deux cotylédons, riches en huile dense très énergétique (**Assla A & Boucetta H.2018**).



Fig. 06 : Le fruit du pistachier de l'Atlas (Mehdeb Djamila.2011).

1.4. Classification botanique

La classification botanique du pistachier de l'Atlas est synthétisée dans le Tableau 1.

Règne	Plantes
Embranchement	Tracheobionta
Super-division	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	Pistacia
Espèce	Pistacia

Tableau 01 : Classification botanique de *Pistacia atlantica* (Assla A & Boucetta H.2018).

1.5. Composition chimique

L'analyse phytochimique de différentes parties de la plante a été l'objet de quelques études. Les potentiels antioxydants des espèces du *Pistacia* sont du en particulier à la présence des flavonoïdes et des flavones, des gallotannins et des phénols simples tels que l'acide gallique et l'acide p-coumarique. D'autres groupes chimiques caractérisent l'huile des fruits du pistachier de l'Atlas : les triterpénoides, les acides gras insaturés tels les acides oléique (46 %), linoléique (27.5 %), palmitique (24 %), palmitoléique (1.23–5.73 %), stéarique (1.48–2.61 %), linoléique (0.95–1.5 %), et les stéroïdes et les triglycérides.

Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle d'oléorésine révèle sa richesse en α -pinène (70 %) et β -pinène (1.94 %). Peu de travaux ont été consacrés sur l'étude des teneurs en polyphénols et les propriétés antioxydantes de différentes parties de *Pistacia atlantica*. Les résultats de ces travaux ont montré la richesse de cette plante en composés phénoliques et l'identification d'un nouveau antioxydant. Une autre étude réalisée a mis en évidence une nouvelle substance anti-*Plasmodium falciparum*, le flavone méthoxycarpachromène dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Pistacia atlantica*.

En outre, une étude plus récente sur les extraits phénoliques de cinq différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas à savoir: les feuilles, les écorces, les gales, les fruits et la parties dégradée de l'arbre (champignon). Les résultats ont montré que les différents extraits sont riches en composés phénolique à l'exception des extraits des écorces. L'analyse de l'activité antioxydante de ces derniers et l'application des technique spectrale ont permis de mettre en évidence deux produits à structure phénolique responsable de cette activité (Assla A & Boucetta H.2018).

1.6. Propriétés thérapeutiques de la *Pistacia atlantica*

La *pistacia atlantica* est une plante médicinale à propriété analgésique, elle est impliquée dans le traitement de la dyspepsie, de l'ulcère peptique, du diabète et de l'infection des yeux. Elle est utilisée aussi pour le stress comme tonique et pour son activité antidiarrhéique et plusieurs activités pharmacologiques comme antioxydante, antibactérienne et antifongique (Les rameaux et feuilles de *P.atlantica* et l'un de ses composant 3-méthoxycarpachromène a montré une activité inhibitrice contre *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* et *Staphylococcus aureus*. La *Pistacia atlantica* a été montré pour contrôler la leishmaniose cutanée dans des souris infectées par *Leishmania major* (Assla A & Boucetta H.2018)), anticancéreuse et anti-hyperglycémie ont été rapportées.

De plus, d'autres études antérieures prouvent qu'elle a aussi des effets antipyrétiques, antiviraux, anti insectes, anti athérogéniques, anticancéreuse, activité hépato-protective, anti-inflammatoires, anti tumorales et antiasthmatique.

En Algérie, la population locale d'une façon très artisanale utilise le fruit du pistachier de l'Atlas qui est riche en matière grasse, comme anti-diarrhéique et aussi en alimentation des troupeaux. Les autres parties de la plante sont impliquées comme un médicament populaire pour traiter la dysenterie, la toux, la jaunisse.

Les fruits trouvent leur application dans la cuisine et les pratiques médicinales algériennes en particulier, dans la région de Djelfa, Laghouat et Ghardaïa.

L'huile de ces fruits comestibles est souvent mélangées aux dattes écrasées et peu être consommées à toute heure de la journée avec du petit lait, elle à un goût très proche de celui du beurre et elle est très appréciée dans ces régions. Les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes.

Le suintement du tronc d'arbre est exploité, en donnant l'encre rouge, cela est utilisé dans la tannerie des peaux.

Notant aussi que la *Pistacia atlantica* est considéré comme l'espèce principale de la production d'oléorésine. Cette résine est produite par l'écorce ensuite sécrétée normalement de façon abondante par temps chaud elle est appliquée comme antiseptique du système respiratoire et aussi pour d'autres usages médicaux (Ilhem Labed.2015).

1.7. Usages traditionnelles de la *Pistacia atlantica*

En Algérie, le fruit du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*), riche en matière grasse, n'est utilisé que par la population locale d'une façon très artisanale en médecine comme anti-diarrhéique et aussi en alimentation des troupeaux. Le suintement du tronc d'arbre donnant l'encre rouge est utilisé dans la tannerie des peaux Cette plante est très utile comme antiseptique, antifongique, et dans les maladies abdominales (Ilhem Labed.2015).

2. La plante de Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

2.1. Définition

La flore Algérienne contient un nombre illimité de plantes présentant des vertus thérapeutiques.

Le *Rosmarinus Officinalis* (Romarin) est une plante utilisée dans divers domaines tels que la médecine traditionnelle et la phytothérapie. Il est aussi utilisé pour améliorer et stimuler la mémoire. Encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens. Le romarin est une plante très riche en huile essentielle, il est cultivé de nos jours à grande échelle en Espagne, en Italie, au Portugal, en France, au Maroc, en Tunisie et en Algérie (figure 07), pour l'extraction de l'huile essentielle. La production mondiale actuelle se monte à environ 300 tonnes (**Chibah Razika & Labandji Assia.2017**).



Fig. 07 : Le romarin cultivé (Chibah Razika & Labandji Assia.2017).

2.2. Habitat et répartition géographique

Originaire des régions méditerranéennes, le Romarin pousse spontanément dans le sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds, modérément secs, les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'ombre (**Athamnia I Djaibet C Zaghdoudi G.2018**).

En Algérie cette plante est bien apparente en différentes régions communes dans les maquis, les garrigues et les forêts claires, il est sub-spontané en plusieurs endroits privilégiant un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec. En Oranie elle est souvent cultivée comme plante d'ornement. Cette plante est retrouvée dans la steppe de la localité de Sidi El Djilali dans la région de Tlemcen (**Belbachir Abdel Fetteh.2018**).

Appellations régionales en Algérie : En plus souvent

Région de l'Est : Eklil

Région de l'Ouest : Helhal

Région du Centre : Yazir (**Bouadjemi Khaled.2018**).

2.3. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau qui se reconnaît de loin à son odeur pénétrante. Cette plante peut atteindre 2m de hauteur. Elle se plaît dans les jardins d'ornement à condition d'être à l'abri du vent, (**Belbachir Abdel Fetteh.2018**).



Fig. 08: *Rosmarinus officinalis* (Belbachir Abdel Fetteh.2018).

2.3.1. Les feuilles

Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs d'une bleue pale, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année (**Bouadjemi Khaled.2018**).



Fig. 09 : Feuille de *Rosmarinus officinalis* (Bouadjemi Khaled.2018).

2.3.2. Racine

C'est la partie souterraine de la plante, spécialisée dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux et dans la fixation au sol, la racine du *Rosmarinus officinalis* est profonde et pivotante (Bouadjemi Khaled.2018).



Fig. 10: Racine de *Rosmarinus officinalis* (Bouadjemi Khaled.2018).

2.3.3. Tige

Arbuste ou sous arbrisseau, rameau de 0.5 à 2 mètres cette tige est tortueuse, anguleuse et fragile. L'écorce est linéaire à cyme axillaire plus ou moins simulant des épis (**Bouadjemi Khaled.2018**).

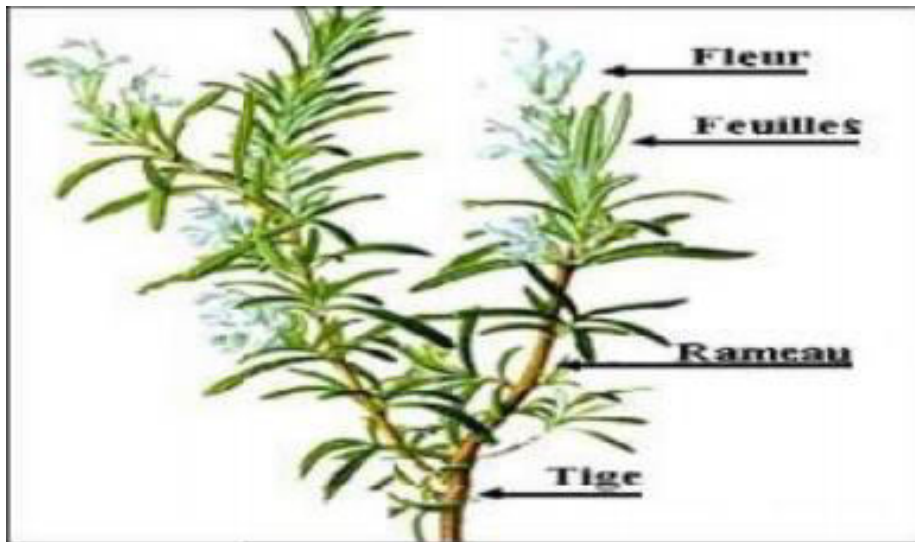


Fig. 11 : Tige principale et rameau Feuillé à fleurs du romarin (Bouadjemi Khaled.2018).

2.3.4. Fleur

Les fleurs sont des pentamères, en général Hermaphrodites. Le calice est plus ou moins bilabié persistant et la corolle bilabée, longuement tubuleuse, parfois à 4-5 lobes subégaux ou à une seule lèvre inférieure trilobée, la supérieure est bilobée.

L'androcée est formé de 4 étamines, la cinquième étant très réduite, parfois 2 étamines et 2 staminodes. Le Gynécée forme 2 carpelles biovulés subdivisés chacun par une fausse cloison en 2 logettes uniovulées. Le style bifide gymno basique est le fruit constitué par 3 akènes plus ou moins soudées par leur face inter (**Bouadjemi Khaled.2018**).



Fig. 12: La fleur de *Rosmarinus officinalis* (Bouadjemi Khaled.2018)

2.3.5. Fruit

Il est tétrakène de forme ovale située au fond du calice. Peut être sous forme de baie, sèche et lisse (Belbachir Abdel Fetteh.2018).



Fig. 13: Fruit de *Rosmarinus officinalis* (Belbachir Abdel Fetteh.2018)

2.4. Classification botanique

La classification botanique du Romarins est synthétisée dans le Tableau 2.

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales (labiales)
Famille	Lamiaceae
Genre	RRomarinus
Espèce	officinalis

Tableau 02: Classification botanique du Romarin (Athamnia I Djaibet C Zaghdoudi G.2018).

2.5. Composition chimique

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' α -pinène (7à80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1à 35%), du bornéol (4à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène.

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial , des acides phénoliques , des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques . L'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage et de la résine. Les sommités fleuries renferment une essence aromatique riche en camphre, en cinéole, en alpha-pinène, en bornéol et en camphène. Elle est riche en tanins, en flavonoïdes (apigénine, diosmine), en diterpènes tricycliques, triterpènes et en acides-phénols, dont l'acide rosmarinique et la rosmaricine.

Concernant les éléments minéraux, la spectrométrie d'émission atomique à pue identifié 18 éléments :

Al : 146.48 mg/kg ; **Ca** : 7791.80 mg/kg ; **Fe** : 330.16 mg/kg ; **K** : 14916.23 mg/kg ; **Mg** : 1634.55 mg/kg ; **Na** : 2711.87 mg/kg ; **P** : 1474.60 mg/kg ;

Cr : 97.36 mg/kg ; **Sr** : 74 .65 mg/kg (**Bouadjemi Khaled.2018**).

2.6. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

Le romarin a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Il possède des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques. Et une action sur le système nerveux. Le romarin possède d'excellentes propriétés anti-oxydante et antimicrobienne. Le romarin, comme toutes les plantes aromatiques et médicinales, contient des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes.

Cette plante est utilisée en médecine en raison de ses différentes propriétés :

- Anti spasmolytiques, diurétiques, hépato protectrices, soulagement des désordres respiratoires. Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydants, chémopréventives.
- Anti-inflammatoires, anti métastatiques.
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires et la prolifération des tumeurs cutanées.
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse. Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV). Alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1.
- On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire.
- Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique. Ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste
- Il est connu pour ces multiples propriétés. En raison de sa teneur en Huile essentielle, en médecine traditionnelle, le romarin aide à la digestion, traite les céphalées et les migraines, les blanchâtes, les coliques, améliore les fonctions hépatiques et biliaires en cas de troubles digestifs.

Il est utilisé en usage externe pour soigner les rhumatismes et les troubles circulatoires. C'est un hypoglycémique, il soigne les affections oculaires .Et est utilisé comme antiseptique, cholagogue, antispasmodique, vulnéraire et diurétique. L'acide rosmarinique développe une activité anti-inflammatoire in vivo chez le rat . L'infusion de feuilles de romarin, calme les nerfs, surtout au moment de la ménopause. Aussi permet de lutter contre certains agents pathogènes : antimycosique et antibactérien, les affections de la peau : infections, plaies, nettoyage de la peau et des zones génitales. Accélère la pousse des cheveux.

L'huile essentielle de Romarin peut déclencher des convulsions et des crises d'épilepsie (Bouadjemi Khaled.2018).

2.7. Utilisation

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique

Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol.

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires.

Il est utilisé sous diverses formes :

- Décoction : le faire bouillir en même temps avec de l'eau.
- Infusion : le mettre dans un liquide initialement bouillant et le laisser refroidir afin qu'il libère tout les éléments actifs.
- Autres : sous forme d'huiles essentielles(en distillant les feuilles), gélules ou bains (Bouadjemi Khaled.2018)

3. les huiles essentielles

3.1. Définition

Elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques soit, par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation sèche (AFNOR).

3.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées de plusieurs molécules chimiques de synthèse naturelle. Ces HE regroupent des "composés majeurs": les alcools, les esters, les aldéhydes, les cétones...etc. L'ensemble de ces composés peut être divisé en deux grands groupes il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

3.2.1. Les composés terpéniques

Les terpènes appartiennent à la vaste famille des isoprénoïdes qui constituent la classe la plus large des métabolites secondaires. La majorité des substances de cette classe sont généralement insolubles dans l'eau. Ils sont subdivisés selon le nombre d'unités isoprène en: monoterpène formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes, formés de trois isoprènes formés de ($C_{15}H_{24}$), diterpènes, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$), tétraterpènes formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes et polyterpènes ($C_{50}H_{80}$) (Tahire K. 2018).

3.2.2. Les mono terpènes

Les mono terpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent deux unités isoprène ($C_{10}H_{16}$).

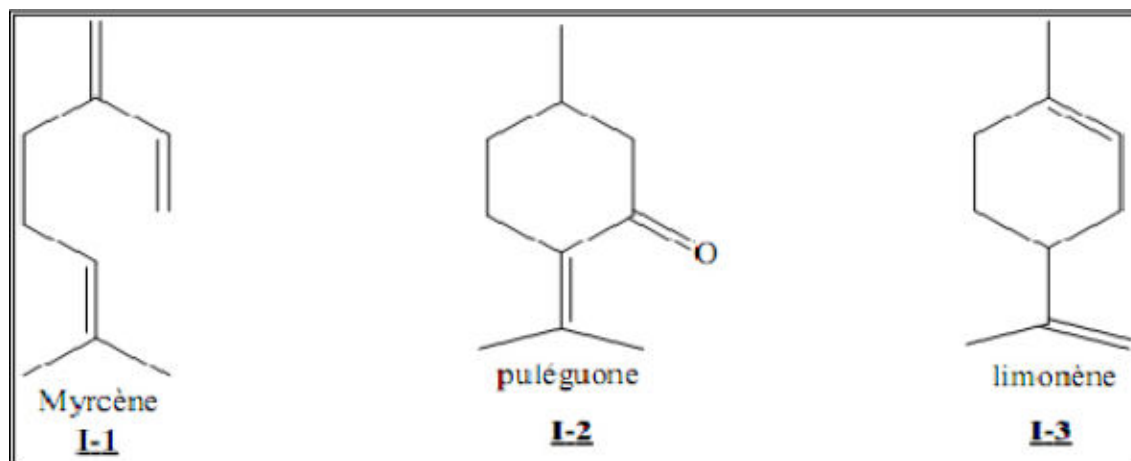


Fig. 14: Exemples de quelques mono terpènes (Tahire K. 2018).

3.2.3. Les sesquiterpènes ($C_{15}H_{22}$)

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bi cycliques, tri cycliques, poly cycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbure oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature (Tahire K. 2018).

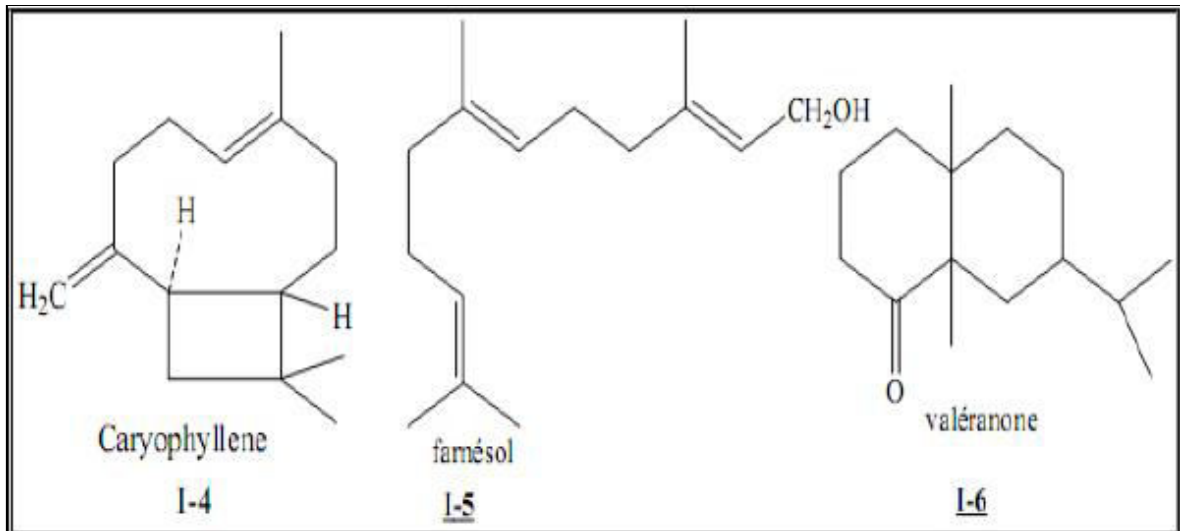


Fig. 15: Exemples de quelques sesquiterpènes (Tahire K. 2018).

3.2.4. Les composés aromatiques

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, L'eugénole, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres.

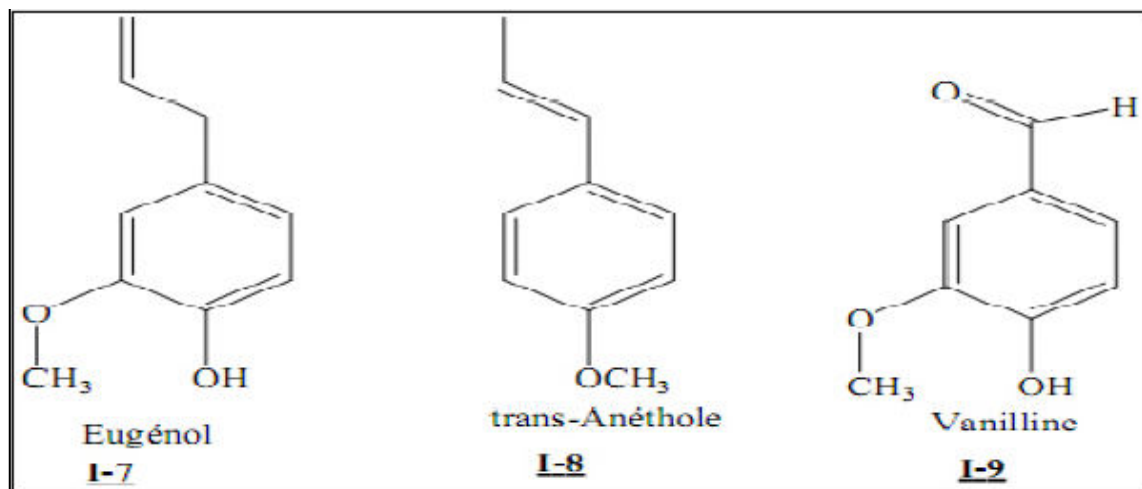


Fig. 16: Exemples de quelques composés aromatiques (Tahire K. 2018).

3.3. Les Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physico-chimiques. Les principales caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles sont :

- Liquide à température ambiante.

- Les huiles sont insolubles dans l'eau soluble dans les alcools.
- Volatile et très rarement coloré.
- A la température ordinaire on trouve généralement les huiles essentielles incolores ou jaune pâle à l'état liquide.
- Les huiles essentielles sont altérable et sensible a l'oxydation il convient alors de les conserver a l'abri de la lumière et de l'humidité (**Tahire K. 2018**).

3.4. Le rôle des huiles essentielles

Les huiles essentielles émises par les plantes sous forme de vapeur ont un impact écologique évident :

- Elles protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons.
- Elle empêche la dessiccation de la plante par évaporation excessive et protègent la plante contre la lumière soit par diminution ou par concentration et maintiennent une certaine humidité autour des plantes des régions arides.
- Elles protègent les parties reproductives de la plante contre les prédateurs (herbivores, insectes).
- Elles interviennent lors de l'interaction végétal-animal et dans les communications plante-plante. Elles attirent les insectes et favorisent la pollinisation par leurs odeurs caractéristiques.

On outre, elles embaument l'atmosphère en exhalant différents parfums ; c'est pour cela beaucoup d'entre-elles sont utilisées en cuisine comme condiments (**Tahire K. 2018**).

3.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles de corps végétales, voici les principale méthodes :

3.5.1. Extraction par hydro distillation de l'huile essentielle

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon figure 17 rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont

se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Tahire K. 2018).

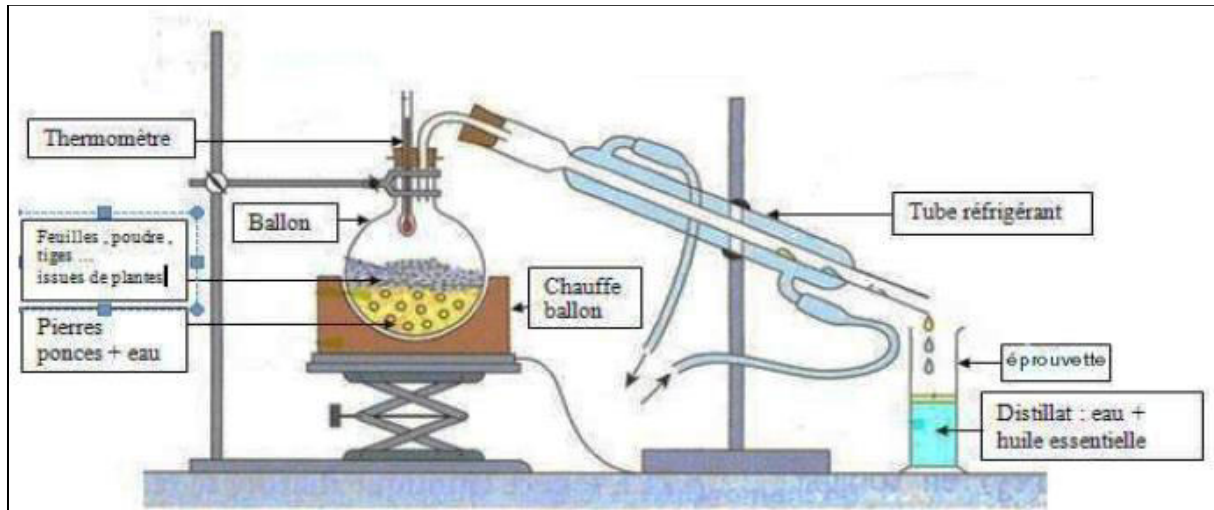


Fig. 17: Schéma d'un Montage d'extraction par hydrodistillation (Tahire K. 2018).

3.5.2. Expression a froids

C'est une technique d'extraction des essences végétale. Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riche en huiles essentielles, ensuite la libérée est entraînée par un courant d'eau qui forme une émulsion constituée d'eau et d'essence, après l'essence est isolée de l'eau grâce à une décantation (Tahire K. 2018).

3.5.3. Entraînement à la vapeur

Cette technique qui ne met pas en contact directe l'eau et la matériel végétale contrairement à l'hydro distillation. Elle est basée sur l'utilisation d'une source de vapeur externe pour extraire et libérer les huiles essentielles de corps végétale.

Durant le passage de la vapeur à travers le matériel végétale, les cellules éclatent et libèrent les huiles essentielles qui seront vaporisées sous l'action de la chaleur pour former un mélange (eau+huiles essentielles).

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en deux phases bien distinctes une phase aqueuse (l'eau aromatique) et une phase organique l'huile essentielle (Tahire K. 2018).

3.5.4. Extraction par les solvants organiques

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone.

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient selon Des hydrolysats :
extraction par solvant en présence d'eau.

- Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué.
- Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- Des résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés.

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement (**Tahire K. 2018**).

1. Objectif

L'objectif de notre étude est d'avoir une raison scientifique sur l'indication ou la contre indication d'utilisation des plantes *Romarinus officinalis* et *Pistacia atlantica* comme premier aliment de nouveau né et cela par l'étude des effets antibactériens sur la flore lactique et intestinale.

2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle du *Romarinus officinalis* a été effectuée par Entraînement à la vapeur au niveau du laboratoire (Université de Saida) qui a été accomplie selon le protocole suivant :

1 kg de feuilles et fleurs fraîches de la plante utilisée ont été introduite dans 5 L imprégné de l'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant se condensent en chutant dans une ampoule à décanter. L'eau et l'huile se séparent alors par différence de densité.



**Fig. 01 : Matériels utilisé dans l'extraction de l'huile essentielle
(Entraînement à la vapeur).**

2.1. Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme AFNOR, le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage (R_{HE}). Il est exprimé par la formule suivante :

$$R_{HE} = (M/M') * 100$$

Nous avons :

M'=1000 g ; M= 13 g

Donc : R_{HE}=1.3

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle de la plante *Romarinus officinalis* est à 1.3%

3. Echantillonnage

L'étude était faite sur deux femmes et leurs nourrissons.

L'échantillonnage a été effectué dans des conditions stériles. Les échantillons de lait ont été recueillis dans des tubes stériles par expression manuelle en utilisant des gants stériles. Auparavant, le sein de la maman avait été nettoyé à l'eau stérile. Les premiers jets ont été éliminés puis le lait a été recueilli dans des tubes stériles. Les échantillons de matières fécales ont été prélevés avec des écouvillons stériles.

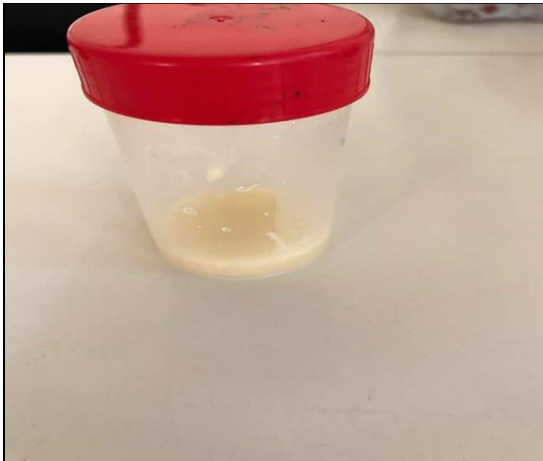


Fig.02 : échantillons pris pour l'étude (Lait maternel et matière fécale).

4. Dilution

La dilution est un procédé consistant à obtenir une solution de concentration inférieure à celle de départ.

4.1. Matériel

Pour le lait sept tubes contenant 9 ml d'eau physiologie et pour matière fécale, 10 tubes, micropipette, des embouts, vortex, bec bunsen .

4.2. Réalisation de la dilution

- Homogénéiser la suspension microbienne à prélever.
- Ouvrir et flamber l'ouverture du tube.
- Prélever 1mL de suspension à l'aide de la micropipette.
- Flamber et refermer le tube.
- Ouvrir le tube de 9 ml de diluant, flamber l'ouverture y introduire le volume prélevé.
- Flamber et refermer le tube.
- Jeter l'embout souiller dans le béccher à eau de javel.

La dilution suivante s'effectue comme la dilution décrite ci-dessus mais en partant du tube de la dilution précédente.



Fig.03 : Dilution effectuée en partant de dilution précédente.

5. Ensemencement

5.1. Matériel

- Les boîtes pétries.
- Micropipette.
- Les embouts.
- Pipette pasteur.
- Bec bunsen.

5.2. Utilisations

- Pour le lait on choisit les dilutions 10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-7} .
- Pour la matière fécale on choisit les dilutions dix 10^{-1} , 10^{-6} et 10^{-10} .

Remarque : Les tests sont appliqués sur toutes les souches prises des échantillons, pour cela nous allons afficher que les résultats positifs des essais.

5.3. Ensemencement en surface

Prélever un volume précis de 0,1 ml à l'aide de la micropipette, puis déposer ce volume au centre de la gélose solide. Étaler à l'aide d'une pipette râteau.

La gélose est une substance nutritive favorisant ou inhibant (selon sa composition) la prolifération et le développement des bactéries. Il s'agit donc du milieu de culture des bactéries.

5.3.1. Les milieux utilisés

5.3.1.1. Le milieu MRS (de Man-Rogosa-Sharpe)

Le milieu MRS est utilisé pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques, en particulier les lactobacilles. Utilisé sous forme liquide ou solide par l'ajout 1% (m/v) d'agar-agar.

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone.....10,00 g
- Extrait de viande10,00 g
- Extrait autolytique de levure5,00 g
- Glucose.....20,00 g
- Tween 80.....1,08 g

- Phosphate di-potassique2,00 g
- Acétate de sodium.....5,00 g
- Citrate d'ammonium.....2,00 g
- Sulfate de magnésium.....0,20 g
- Sulfate de manganèse.....0,05 g
- Agar agar bactériologique.....15,00 g

Le pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : $5,7 \pm 0,1$

Le tableau 01 représente les résultats de l'ensemencement dans un milieu MRS après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.





Echantillons	Lait maternel	Matière fécale
01		
02		

Tableau. 01: Ensemencement est dans un milieu MRS après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

5.3.1.2. Le milieu King B

Le milieu de King B permet la détection de la synthèse de pyoverdine, pigment élaboré par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas*. Utilisé en parallèle avec le milieu de King A (détection de la pyocyanine), Il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*

Les ingrédients sont en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée :

- Peptone de viande 10,00
- Peptone de caséine 10,00
- Phosphate dipotassique 1,50
- Sulfate de magnésium 1,50
- Agar 15,00
- pH final à 25°C : $7,2 \pm 0,2$

Le tableau 02 représente les résultats de l'ensemencement dans un milieu King B après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h


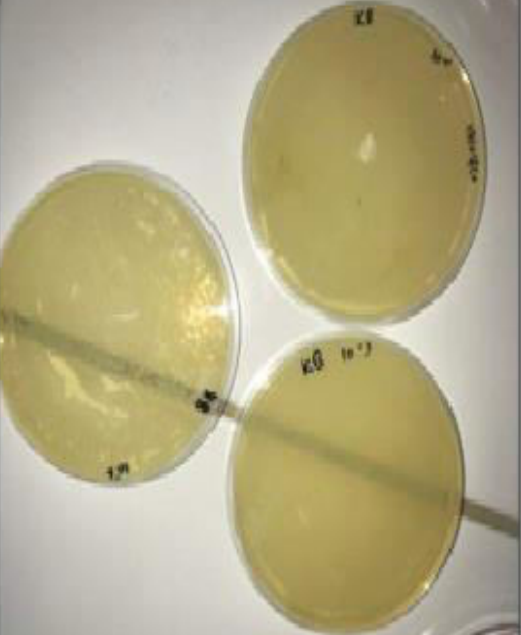
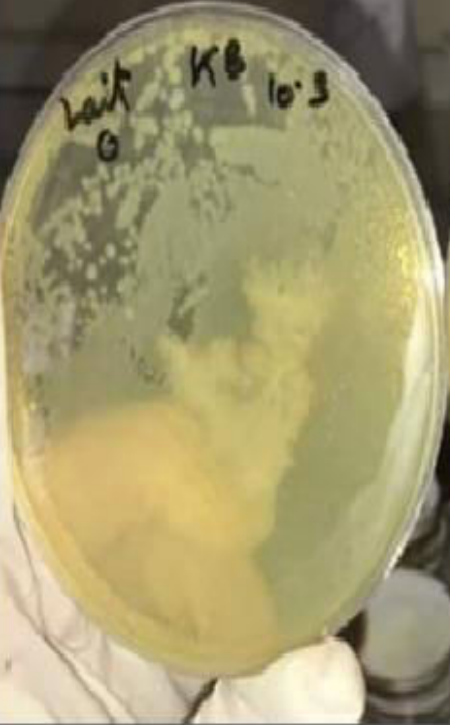

Echantillons	Lait maternel	Matière fécale
01		
02		

Tableau. 02: Ensemencement dans un milieu King B après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

5.3.1.3. Le milieu King A

Le milieu de King A permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). Utilisé en parallèle avec le milieu de King B (détection de la pyoverdine), il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les ingrédients sont en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée :

- Peptone 20,00
- Sulfate de potassium 10,00
- Chlorure de magnésium 1,40
- Agar 15,00

Le pH final à 25°C : 7,2 ±0,2

Dans ce test les résultats sont positifs que pour l'échantillon 02.

Le tableau 03 représente les résultats de l'ensemencement dans un milieu King A après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h



Echantillon	Lait maternel	Matière fécale
02		

Tableau. 03: Ensemencement dans un milieu King A après incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

5.3.1.4. Le milieu Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des bacilles Gram (-) entéropathogènes, en particulier les Salmonelles sp. et les Shigella sp.

La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence de sels biliaires, de bleu de bromothymol et de fuchsine acide (inhibition des bactéries à Gram (+), des E. coli et dans une moindre mesure, des Proteus et des Citrobacter).

Les ingrédients sont en gramme par litre d'eau distillé :

- Hektoen 76,67
- Agar 2

Dans de test les résultats sont positifs pour les deux échantillons que dans la matière fécale.

Le tableau 04 représente l'ensemencement dans un milieu hektoen après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h (Matière fécale).

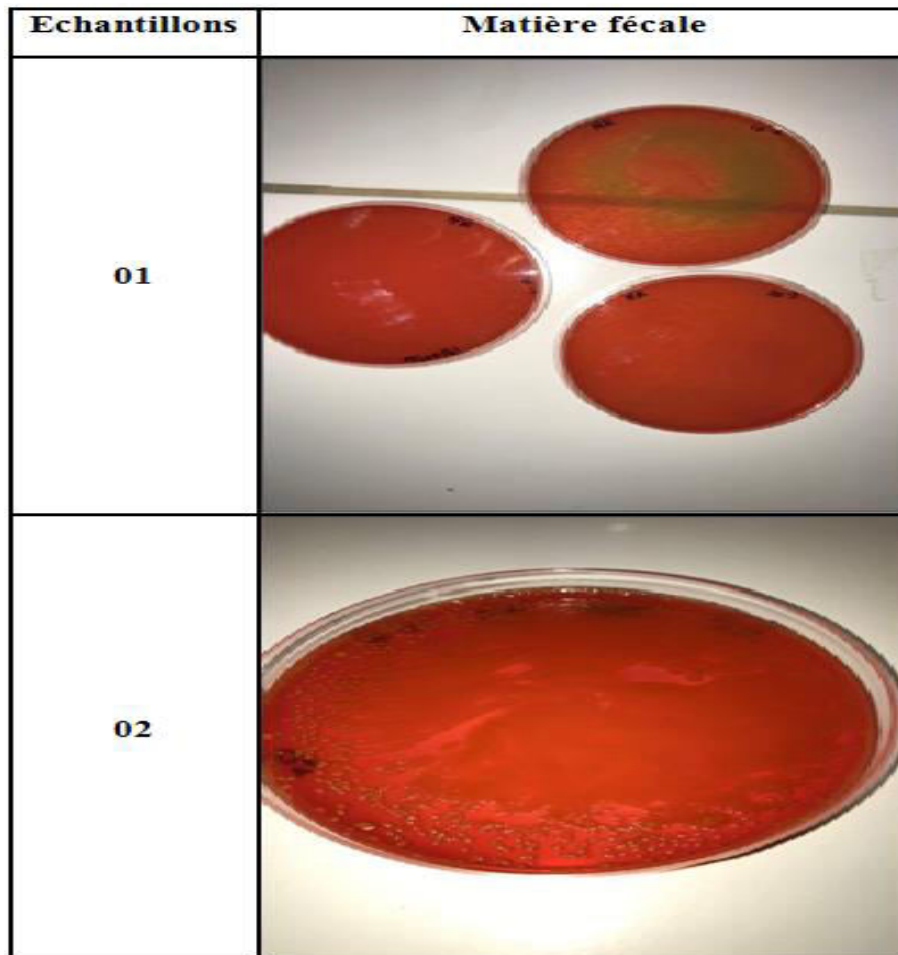


Tableau. 04 : Ensemencement dans un milieu hektoen après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h (Matière fécale).

5.3.1.5. Le milieu EMB

Milieu utilisé pour l'isolement des entérobactéries favorisant le développement des coliformes.

Repose sur l'aptitude des entérobactéries à fermenter ou non le lactose et ou le saccharose.

Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des autres bactéries par l'éosine et le bleu de méthylène.

Les ingrédients sont en gramme par litre d'eau distillé :

- Lactose monohydrate 5
- Potassium dihydrogène 2
- Bleu de méthyle hydrate 0,4
- Peptone water 10
- Eosine 0,4
- Agar 20

Dans ce test le résultat est négatif dans le lait maternel de l'échantillon 01.

Le tableau. 05 représente l'ensemencement dans un milieu EMB après incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

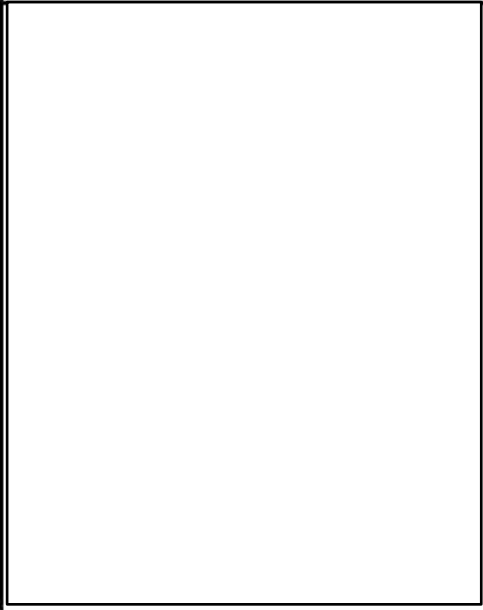

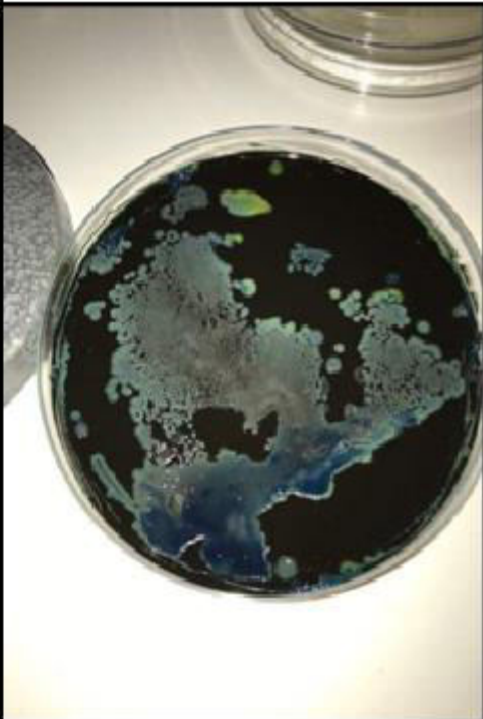

Echantillons	Lait maternel	Matière fécale
01		
02		

Tableau. 05: Ensemencement dans un milieu EMB après incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

5.3.1.6. Le milieu SS (Salmonella Schegilla)

La gélose S.S. agar est un milieu sélectif différentiel pour l'isolement des Salmonella et de certaines Shigella.

La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence de vert brillant et de sels biliaries qui inhibent totalement la croissance des bactéries à Gram (+) et partiellement celle des coliformes et des Proteus. La différenciation des Shigella et des Salmonella est basée sur leur incapacité à fermenter le lactose (colonies incolores) et sur la réduction des sulfates en sulfure en présence de citrate ferrique par les Salmonella H₂S (+) (colonies à centre noir).

Les ingrédients sont en gramme par litre d'eau distillé :

- Bactobee extrait 5
- Peptone 5
- Lactose 10
- Bactobile salt 8,5
- Sodium citrate 8,5
- Sodium thiosulfate 8,5
- Ferric citrate 1
- Agar 13,5
- Bacto brillant green 0,33
- Bacto neutral red 0,025

Dans de test les résultats sont positifs pour les deux échantillons que dans la matière fécale.

Le tableau 06 représente l'ensemencement dans un milieu SS après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h (Matière fécale).



Echantillons	Matière fécale
01	 A petri dish containing a bacterial culture on SS (Shigella Selective) medium. The medium is a dark, reddish-brown color. The surface is covered with a dense, confluent layer of dark, irregular bacterial colonies, indicating a high concentration of viable organisms.
02	 A petri dish containing a bacterial culture on SS (Shigella Selective) medium. The medium is a dark, reddish-brown color. The surface shows sparse, scattered bacterial colonies, indicating a lower concentration of viable organisms compared to sample 01.

Tableau. 06: Ensemencement dans un milieu SS après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h (Matière fécale).

5.3.1.7. Le milieu GN (gélose nutritive)

La Gélose Nutritive est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Les ingrédients sont en gramme par litre d'eau distillé :

- Extrait de viande 1
- Extrait de levure 2
- Peptone 5
- Sodium chlorid 5

L'incubation est à 37 degrés pendant 24 h a 48h

Le tableau 07 représente l'ensemencement dans un milieu GN après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h





Echantillons	Lait maternel	Matière fécale
01		
02		

Tableau. 07: Ensemencement dans un milieu GN après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

5.4. Ensemencement en masse

Prélever un volume précis de 1 ml à l'aide de la micropipette, puis déposer ce volume sur une boîte de Petrie vide et couler 10 mL de milieu MRS. Homogénéiser en gardant à la boîte de pétrie fermée des mouvements circulaires (en dessinant des 8 sur la paillasse). Laisser refroidir la gélose sans la bouger.

On utilise le parafilm sur les bordures de la boîte pour assurer beaucoup plus l'anaérobiose. Le tableau 08 représente l'ensemencement en masse dans un milieu MRS après une incubation à 30°C pendant 48h à 72h





Echantillons	Lait maternel	Matière fécale
01		
02		

Tableau. 08: Ensemencement en masse dans un milieu MRS après une incubation à 30°C pendant 48h à 72h.

6. Purification

Les colonies isolées sont repiquées de façon alternée sur milieu solide jusqu'à purification. La pureté des souches est vérifiée par l'observation macroscopique et microscopique des colonies (forme, couleur, taille).

6.1. Observation macroscopique

Les tableaux ci-dessous représentent des souches pures prises des milieux utilisés :









Lait maternel					
Milieu	MRS	King B	EMB	GN	Ensemencement en masse
Echantillons			Résultat négatif		Résultat négatif
01					
02					

Tableau. 09 : souches pures prises des milieux utilisés (Lait maternel).







Matière fécale				
Milieu	MRS	King B	King A	Hektoen
Echantillons			Résultat négatif	
01				
02		Résultat négatif		

Tableau. 10: souches pures prises des milieux utilisés (Matière fécale).






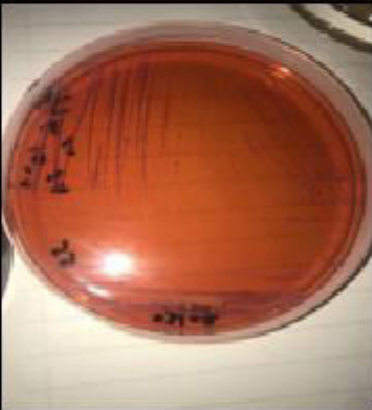


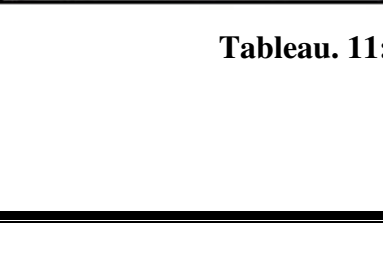
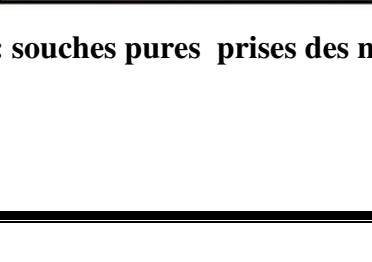
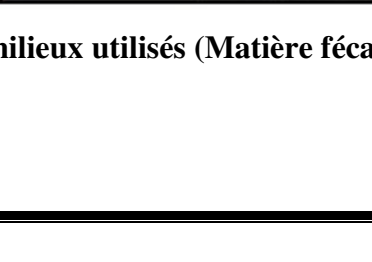

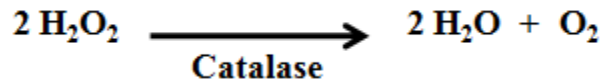
Matière fécale				
Milieu	EMB	SS	GN	Ensemencement en masse
Echantillons				
01				
02				

Tableau. 11: souches pures prises des milieux utilisés (Matière fécale).

6.1.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), Produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H₂O et 1/2 O₂.



6.1.1.1. La technique

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- Y déposer, à l'aide de l'anse de platine une colonie isolée de la souche à tester.
- Observer l'apparition de bulles.

6.1.2. Test de Citrat de Simmon

La gélose Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) est utilisée pour la différenciation des bacilles Gram négatifs. Il permet la recherche du citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie pour les bactéries. Ce milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries.

6.1.3. Test TSI/Gélose (triple sugar iron)

Repose sur l'aptitude ou l'incapacité des entérobactéries à fermenter le glucose (avec ou sans dégagement de gaz), le lactose le saccharose et à réduire le sulfate en sulfure qui, en présence de fer, donne un précipité noir de sulfure de fer.

Le tableau 12 représente les résultats des tests (TSI et Citrate de Simmon) sur les souches pures des deux échantillons.

Echantillons	Lait maternel	Matière fécale
01		
02		

Tableau. 12: Test de TSI et Citrate de Simmon

Le tableau 13 représente les résultats des tests de TSI et Citrate de Simmon sur des souches prises d'un ensemencement en masse au milieu MRS (lait et matière fécale)



Echantillons	Lait et matière fécale
01	
02	

Tableau. 13: Test de TSI et Citrate de Simmon sur des souches prises d'un ensemencement en masse au milieu MRS (lait et matière fécale)

6.1.4. Test de clark et lubs

Le milieu de Clark & Lubs permet de différencier les Enterobacteriaceae avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu.

Le tableau 14 représente les résultats de l'interaction entre le milieu Clark & Lubs et le RM dans des souches pures prises des milieux précédents (laitmaternel et matière fécale).





Echantillons	rouge de méthyle	Voges-Proskauer
01		
02		

Tableau. 14: Interaction entre le milieu Clark & Lubs et le RM dans des souches pures prises des milieux précédents (Lait maternel et matière fécale).

Les tableaux 15, 16, 17 et 18 résument les résultats obtenus des tests précédents.

Echantillon 01

Lait maternel								
Milieu	Catalase	TSI				Citrate	Clark et Lubs	
		Culot	Pente	Gaz	H ₂ S		RM	VP
King B 10 ⁻¹ s1	+	Jaune +	+	-	-	Bleu +	-	-
		Jaune +	+	-	-		Vert -	+
King B 10 ⁻¹ s2	+	Jaune +	+	-	-	Vert -	+	-
King B 10 ⁻⁶	+	Jaune +	+	-	-	Vert -	+	-
GN 10 ⁻³	+	Jaune +	+	-	-	Vert -	+	-
GN 10 ⁻⁶	-	Jaune +	+	-	-	Vert -	+	+
MRS 10 ⁻¹ Surface	-						+	-
MRS 10 ⁻¹ Masse	+	Jaune +	+	-	-	Vert -	+	-

Tableau. 15: Résultats des tests (Lait maternel)

Echantillon 01

Matière fécale								
Milieu	Catalase	TSI				Citrate	Clark et Lubs	
		Culot	Pente	Gaz	H ₂ S		RM	VP
EMB 10 ⁻⁶ ₆	+	Jaune +	Rouge -	-	-	Vert -	+	-
		Jaune +	Rouge -	-	-	Bleu +		
GN 10 ⁻⁶	+	Jaune +	Jaune +	-	-	Vert -	+	-
MRS 10 ⁻³ Surface	-	Jaune +	Jaune +	-	-	Vert -	+	+
MRS 10 ⁻¹ Masse	-						+	-
SS 10 ⁻⁶	+	Jaune +	Jaune +	+	-	Vert -	+	-
HK 10 ⁻⁶	+	Jaune +	Rouge -	+	+	Vert -	+	-
King B 10 ⁻⁶	+	Jaune +	Rouge -	+	-	Vert -	+	-

Tableau. 16: Résultats des tests (Matière fécale)

Echantillon 02

Lait maternel								
Milieu	Catalase	TSI				Citrate	Clark et Lubs	
		Culot	Pente	Gaz	H ₂ S		RM	VP
GN 10⁻⁷	+	Jaune +	Jaune +	-	-	Vert -	-	-
King B 10⁻³	+	Jaune +	Jaune +	+	-	Bleu +	+	-
EMB 10⁻³	+	Jaune +	Jaune +	+	-	Bleu +	-	+
MRS 10⁻³ Masse	-	Jaune +	Jaune +	+	-	Vert -	+	-
King A 10⁻¹	+	Jaune +	Jaune +	-	-	Bleu +	-	+
MRS 10⁻¹	-	Jaune +	Jaune +	+	-	Vert -	+	-
MRS 10⁻⁷ Masse	-	Jaune +	Jaune +	-	-	Bleu +	-	+

Tableau. 17: Résultats des tests (Lait maternel)

Echantillon 02

Matière fécale								
Milieu	Catalase	TSI				Citrate	Clark et Lubs	
		Culot	Pente	Gaz	H ₂ S		RM	VP
HK 10 ⁻⁶	-	Jaune +	Jaune +	+	-	Vert -	+	+
SS 10 ⁻¹	-	Jaune +	Jaune +	+	-	Vert -	+	-
MRS 10 ⁻¹⁰		Jaune +	Jaune +	+	-	-	+	-
King B 10 ⁻¹ S1	+	Jaune +	Rouge -	+	-	-	+	-
GN 10 ⁻¹⁰	+	Jaune +	Jaune +	+	-	-	+	-
King A 10 ⁻⁶	+	Jaune +	Rouge -	+	-	-	+	-
EMB 10 ⁻⁶	-	Jaune +	Jaune +	+	-	-	+	-
MRS 10 ⁻⁶ Masse	-	Jaune +	Jaune +	+	-	-	+	-
King B 10 ⁻¹ S2	-	Jaune +	Rouge -	+	-	-	+	-
MRS 10 ⁻³ Masse		Jaune +	Jaune +	-	-	-	+	-

Tableau. 18: Résultats des tests (Matière fécale)

6.2. Observation microscopique

6.2.1. Coloration de gram

La coloration de gram est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G-) et les bactéries Gram positives (G+). Celle-ci diffèrent de part la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, ou la présence d'une membrane externe.

6.2.1.1. La technique :

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.
- Toucher une colonie à l'aide d'une anse de platine
- Frotter l'anse de platine dans la goutte d'eau
- Passer la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de **violet de gentiane** (cristal violet) sur le frottis fixé.
- laisser agir 1 minute
- Jeter l'excès de colorant dans un bécher.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes de **lugol** sur le frottis. Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l'H₂O comme précédemment décrit.
- **Décoloration à l'alcool**
- Rincer à l'H₂O.
- Contre-colorer en déposant la solution de **safranine** (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- Rincer à l'H₂O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 100x ou, avec une goutte d'huile à immersion)

Le tableau 19 représente les résultats de coloration de Gram des ensemencements des échantillons du lait maternel dans les milieux utilisés.

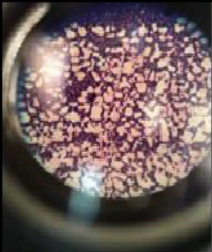
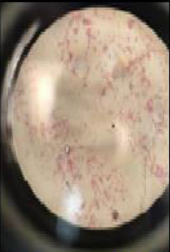


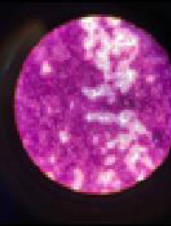
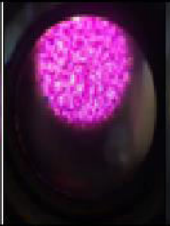
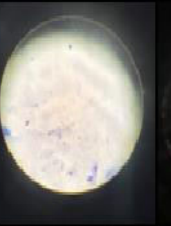

Lait maternel						
Milieu	MRS	King B	King A	EMB	GN	Ensemencement en masse
Echantillons			Pas de résultat	Pas de Résultat		Pas de Résultat
01						
Résultats	Coccobacille Gram positif	Coccobacille Gram négatif			Cocci Gram négatif	
02	Pas de résultat					
Résultats		Cocci Gram positif	Coccobacille Gram positif	Cocci Gram négatif	Coccobacille Gram positif	Bacille Gram positif

Tableau. 19 : Coloration de Gram des ensemencements dans les milieux utilisés (Lait maternel).

Les tableaux 20 et 21 représentent les résultats de coloration de Gram des ensemencements des échantillons de la matière fécale dans les milieux utilisés.



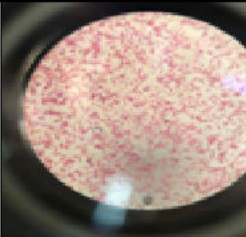
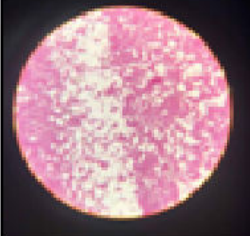
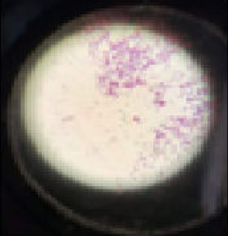

Matière fécale				
Milieu	MRS	King B	King A	Hektoen
Echantillons			Pas de résultat	
01				
Résultats	Cocci en chaînette Gram positif	Coccobacille Gram négatif		Bacille Gram négatif
02	Pas de résultat			
Résultats		Cocci Gram négatif	Cocci Gram négatif	Bacille Gram Positif

Tableau. 20: Coloration de Gram des ensemencements dans les milieux utilisés (Matière fécale).

Matière fécale				
Milieu	EMB	SS	GN	Ensemencement en masse
Echantillons				
01				
Résultats	Cocci Gram positif Bacille Gram négatif	Bacille Gram négatif	Coccobacille Gram négatif	Diplocoque Gram négatif
02		Pas de résultats		
Résultats	Diplocoque Gram négatif		Cocci chaîne Gram positif	Bacille Gram négatif

Tableau. 21: Coloration de Gram des ensemencements dans les milieux utilisés (Matière fécale).

7. Activité antibactérienne

Dans le laboratoire conditionné d'une zone d'asepsie ou tous les matériels utilisés sont stériles. À partir de plusieurs souches pures venantes du lait maternel et méconium de nouveau né et en utilisant l'anse de platine, nous avons pris 5 colonies de bactéries en les mettant dans un tube de 5 ml d'eau distillée, après nous agitions le tube, suite à l'agitation, nous passons à l'écouvillonnage du tube puis à l'ensemencement dans une boîte pétrie contenant un milieu de culture de type Muller Hinton, nous mettons un disque imbibé qui contient l'huile essentielle étudiée et nous attendons 24 heures pour discuter les résultats.

Le travail original est conçu à l'appliquer sur deux échantillons en utilisant deux huiles essentielles (Pistacia et Romarin) afin d'avoir une conclusion fiable et décisive, mais dans notre cas nous allons traiter que par l'huile essentielle de la plante Romarin car nous n'avons pas le temps d'extraire l'huile essentielle de la plante Pistacia à cause du cas exceptionnelle ou nous n'avions pas eu l'accès au laboratoire pour accomplir notre travail.

Le tableau 22 représente les résultats des activités antibactériennes dans les souches du lait maternel des deux échantillons.









Lait maternel					
Milieu	MRS 10 ⁻¹	King B 10 ⁻¹	King B 10 ⁻⁶	GN 10 ⁻⁶	MRS masse 10 ⁻¹
Echantillons	Echantillon de lait				
01					
Milieu	EMB 10 ⁻³	MRS masse 10 ⁻⁷	MRS masse 10 ⁻³		
02					

Tableau. 22: Résultats des activités antibactériennes (Lait maternel).

Le tableau 23 représente Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'huile essentielle Romarin dans les souches du lait maternel.

Echantillons	Lait maternel					
	Milieu	MRS 10 ⁻¹	King B 10 ⁻¹	King B 10 ⁻⁶	GN 10 ⁻⁶	MRS masse 10 ⁻¹
01	Diamètre (mm)	0	2	5	0	0
02	Milieu	EMB 10 ⁻³	MRS masse 10 ⁻⁷	MRS masse 10 ⁻³		
	Diamètre (mm)	0	4	2		

Tableau. 23: Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'huile essentielle Romarin (Lait maternel).

Le tableau 24 représente les résultats des activités antibactériennes dans les souches de la matière fécale des deux échantillons.





Matière fécale	
Milieu	HK 10 ⁻⁶
Echantillons	
01	
Milieu	MRS masse 10 ⁻⁶
Echantillons	
02	

Tableau. 24: Résultats des activités antibactériennes (Matière fécale).

Le tableau 25 représente Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'huile essentielle Romarin dans les souches de la matière fécale.

Echantillons	Matière fécale	
	Milieu	HK 10 ⁻⁶
01	Diamètre (mm)	8
	Milieu	MRS masse 10 ⁻⁶
02	Diamètre (mm)	0

Tableau. 25: Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'huile essentielle Romarin (Matière fécale).

8. Discussion de résultat

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques imbibés à l'huile essentielle de la plante Romarin officinal. A l'aide d'une règle (mm) nous mesurons les diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque pour effectuer la lecture des résultats.

- Si le diamètre est compris entre 0 et 8 mm, les bactéries sont résistantes à l'inhibiteur (non sensible).
- Si le diamètre est compris entre 9 et 14 mm, il y a une sensibilité.
- Si le diamètre est compris entre 15 et 19 mm, il y a une bonne activité antibactérienne dans la zone d'inhibition (très sensible).
- Si le diamètre est supérieur à 20 mm, il y a une très bonne activité antibactérienne (extrêmement sensible).

Les tableaux 23 et 25 montrent que le diamètre diffère d'une souche à l'autre entre 0 et 8mm (non sensible), alors il y a une résistance des bactéries à l'inhibiteur. Ce qui implique l'absence des activités antibactériennes.

Selon **Benikhlef .A** le diamètre de la zone d'inhibition de l'*E.coli* est 12 mm.

Selon **Berkani, Hamdi et Rezkellah** le diamètre de la zone d'inhibition de l'*E.coli* est 8mm et 0 mm pour la *P.aeruginos*.

Donc de ce qui précède, l'extrait de l'huile essentielle de la plante *Romarinus officinalis* dans notre cas ne joue pas son rôle inhibiteur au niveau des souches étudiées.

Conclusion générale

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la réalisation d'un mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master en Biologie, option : Microbiologie.

L'objectif fixé à travers ce travail de mémoire est d'avoir une raison scientifique sur l'indication ou la contre indication d'utilisation des plantes *Romarinus officinalis* et *Pistacia atlantica* comme premier aliment de nouveau né et cela par l'étude des effets antibactériens sur la flore lactique et intestinale.

Le présent travail a concerné des définitions et éclaircissement sur la flore intestinal et son développement chez les nouveaux nés. En deuxième lieu nous avons fais un aperçu sur l'allaitement maternel et son importance.

Ensuite nous avons présenté les plantes étudiées (*Romarinus officinalis* et *Pistacia atlantica*) utilisations et les plusieurs méthodes d'extraction de leurs huiles essentielles.

La dernière partie de ce mémoire a permis de données des notions générales sur :

- l'extraction des huiles essentielles des plantes étudiées spécifiquement la méthode que nous avon utilisé (entraînement à la vapeur).
- La méthode d'échantillonnage.
- La dilution et le matériel utilisé pour.
- L'ensemencement et les matériel utilisé pour.
- La méthode de purification.

Enfin, après l'application des huiles essentielle précisément celle de la plante *Romarinus officinalis* sur les souches étudiées, nous avons remarqué l'absence des activités antibactériennes. Alors nous constatons que l'huile essentielle utilisée ne joue pas son rôle inhibiteur.

Références bibliographiques

- Abbassa A et Moussa I .2018 :** La production de cobalamine par les bactéries probiotiques. Mémoire de Master en Science Alimentaire. Université de Mostaganem
- Adrien BRUNO .2013 :** Mise au sein précoce après une césarienne pour favoriser l'allaitement maternel. Mémoire de Fin d'Études Travail de Bachelor. Haute école de santé Genève.
- AFNOR :** Association française de normalisation.
- Assla A & Boucetta H.2018 :** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* Desf (in vitro). Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Université de Khemis Miliana.
- Athamnia.I, Djaibet.C, Zaghoudi.G.2018:** Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* et du *Thymus capitatus L.* sur des agents d'otomycose : Cas d'*Aspergillus niger*. Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Université de Guelma.
- Beaudry et al, 2006:** biologie de l'allaitement : le sein, le lait, le geste, Québec : presses de l'université du Québec.
- Belbachir Abdel Fetteh.2018 :** Contribution à l'étude phyto- écologique et anatomique des deux espèces médicinales (*Rosmarinus officinalis* et *Juniperus oxycedrus*) Dans les matorrals de Sidi Djilali (Réponses aux perturbations). Mémoire de Master En Foresterie. Université de Tlemcen. Option : Protection des forêts.
- Belfatmi S et Souidi F, 2018 :** Contribution à la caractérisation de la flore du lait maternel et des selles des nouveau-nés d'un échantillon de la population de l'Ouest Algérien. Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Option : Microbiologie Appliquée. Université d'Ain Témouchent.
- Benikhlef, 2014 :** Comparaison entre les huiles essentielles et leurs effets antibactériens sur *Rosmarinus officinalis* de la région de Béchar et Ouergla.
- Berkani, Hamdi et Rezkallah, 2013 :** Détermination de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.
- Bouadjemi Khaled.2018 :** Etude comparative des différents parties de la plante romarin «*Rosmarinus officinalis*» par rapport aux pouvoirs antibiotiques sur le yaourt. Mémoire de Master en Agronomie. Université de Mostaganem.
- Chibah Razika & Labandji Assia.2017 :** Extraction et caractérisation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et l'étude de quelques activités biologiques. Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Université de Bouira.
- Djenidi Habiba.2012 :** Etude du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Desf.*): essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne. Mémoire de magister en Biologie. Université de Biskra. Option : Biotechnologies.

Fernandez et al, 2013: The microbiota of human milk in healthy women. Cell mol boil (Noisy-le-grand)59:31-42.

Hamosh, 2001: Bioactive factors in human milk. pediatric clinics of North America 48:69-68.

Ihem Labeled.2015 : composition chimique et évaluation des activités biologiques des huiles essentielles de *pistacia atlantica* desf.et de *ferula vesceritensis* coss. & dur. Et synthèse catalytique de nouveaux dérivés piperidinique. Thèse de doctorat. Université de Constantine.

Jeurink et al, 2013: human milk: a source of more life than we imagine. Beneficial microbes 4: 17- 30.

Josephine Chevalier, 2018 : Microbiote intestinal : de la physiologie à la pathologie. Exemple de la maladie de Parkinson. Thèse de docteur en pharmacie. Université de Lille 2.

Laure Frayssinhes, 2017 : Implication du microbiote intestinal dans la sante et enjeux thérapeutiques. Thèse de docteur en pharmacie. Université Toulouse iii Paul Sabatier.

Mehdeb Djamila.2011 : Etude de la variabilité morphologique du pistachier de l'Atlas (*pistacia atlantica* Desf.) dans la région de Tiaret. Mémoire de magister. Université d'Oran. Option : Valorisation, conservation et restauration.

Martin et al, 2003: human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. The journal of pediatrics 143:754-785.

M. Tackoen, 2012 : Le lait maternel : composition nutritionnelle et propriétés fonctionnelles. Centre Néonatal, C.H.U. Saint-Pierre.

Olivares et al, 2006: Antimicrobial potential of four lactobacillus strains isolated from breast milk. Journal of applied microbiology 101:72-79.

Rigourd et al, 2011 : Allaitement maternel : bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. Pédiatrie : 08.

Scholtens et al, 2012: the early settlers: intestinal microbiology in early life. Annu rev food sci technol 3: 425-447.

Tahire K.et Arif T 2018 : Etude de l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de lentisque pistachier (*Pistacia lentiscus*). Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Université de Bouira.

Ward et al, 2006: in vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *lactobacillus gasseri*. Applied and environmental microbiology 72:4497-4499.

Zivkovic et al, 2011: Human milk glyco biome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America 108 suppl 1:4653-4658.

Liste des figures

Chapitre 01 :

Fig. 01	Influence de l'accouchement sur la composition du microbiote.	04
Fig. 02	Evolution du microbiote intestinal au cours des deux premières années de vie.	05
Fig. 03	Fonction du microbiote intestinale.	06
Fig. 04	Potentiel digestif du microbiote humain.	09
Fig. 05	Schéma de la digestion des glucides : La dégradation des polysaccharides conduit à la formation de produits de fermentation bactérienne.	10
Fig. 06	Produits issus de la fermentation.	11
Fig. 07	dialogue entre microbiote et système immunitaire.	14
Fig. 08	Colonisation naturelle de l'intestin d'un nouveau-né au cours des dix premiers jours de vie.	16

Chapitre 02 :

Fig. 01	Composants protecteurs du lait maternel.	23
---------	--	----

Chapitre 03 :

Fig. 01	Nouveau plant à l'intérieur de Zizuphus lotus.	28
Fig. 02	Les feuilles du pistachier de l'Atlas.	29
Fig. 03	L'inflorescence du pistachier de l'Atlas.	29
Fig. 04	Les fleurs males du pistachier de l'Atlas.	30
Fig. 05	Les fleurs femelles du pistachier de l'Atlas.	31
Fig. 06	Le fruit du pistachier de l'Atlas.	32
Fig. 07	Le romarin cultivé.	35
Fig. 08	Rosmarinus officinalis.	36
Fig. 09	Feuille de Rosmarinus officinalis.	37
Fig. 10	Racine de Rosmarinus officinalis.	37
Fig. 11	Tige principale et rameau Feuillé à fleurs du romarin.	38
Fig. 12	La fleur de Rosmarinus officinalis.	39
Fig. 13	Fruit de Rosmarinus officinalis.	39
Fig. 14	Exemples de quelques mono terpènes.	43
Fig. 15	Exemples de quelques sesquiterpènes.	44
Fig. 16	Exemples de quelques composés aromatiques.	44
Fig. 17	Schéma d'un Montage d'extraction par hydrodistillation.	46

Chapitre 04 :

Liste des figures

Fig. 01	Matériels utilisé dans l'extraction de l'huile essentielle (Hydrodistillation).	48
Fig. 02	échantillons pris pour l'étude (lait maternel et matière fécale).	49
Fig. 03	Dilution effectuée en partant de dilution précédente	50

Liste des tableaux

Chapitre 02 :

Tableau 01	Teneurs indicatives en énergie, protéines, lipides, carbohydrates et minéraux du lait de femme	18
Tableau 02	Composés azotés du lait maternel	19
Tableau 03	Minéraux du lait maternel	21
Tableau 04	Vitamines du lait maternel	22

Chapitre 03 :

Tableau 01	Classification botanique de <i>Pistacia atlantica</i>	32
Tableau 02	Classification botanique du Romarin	40

Chapitre 04 :

Tableau.01	Ensemencement est dans un milieu MRS après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.	53
Tableau.02	Ensemencement dans un milieu King B après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.	55
Tableau.03	Ensemencement dans un milieu King A après incubation à 37°C pendant 24h à 48h	56
Tableau.04	Ensemencement dans un milieu hektoen après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h (Matière fécale).	57
Tableau. 05	Ensemencement dans un milieu EMB après incubation à 37°C pendant 24h à 48h.	59
Tableau. 06	Ensemencement dans un milieu SS après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h (Matière fécale).	61
Tableau. 07	Ensemencement dans un milieu GN après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.	62
Tableau. 08	Ensemencement en masse dans un milieu MRS après une incubation à 30°C pendant 48h à 72h.	63
Tableau.09	souches pures prises des milieux utilisés (Lait maternel).	65
Tableau. 10	souches pures prises des milieux utilisés (Matière fécale).	66
Tableau. 11	souches pures prises des milieux utilisés (Matière fécale).	67
Tableau. 12	Test de TSI et Citrate de Simmon	69

Liste des tableaux

Tableau. 13	Test de TSI et Citrate de Simmon sur des souches prises d'un ensemencement en masse au milieu MRS (lait et matière fécale)	70
Tableau. 14	Interaction entre le milieu Clark & Lubs et le RM dans des souches pures prises des milieux précédents (Lait maternel et matière fécale)	71
Tableau. 15	Résultats des tests (Lait maternel)	72
Tableau. 16	Résultats des tests (Matière fécale)	72
Tableau. 17	Résultats des tests (Lait maternel)	73
Tableau. 18	Résultats des tests (Matière fécale)	74
Tableau.19	Coloration de Gram des ensemencements dans les milieux utilisés (Lait maternel).	76
Tableau.20	Coloration de Gram des ensemencements dans les milieux utilisés (Matière fécale).	76
Tableau.21	Coloration de Gram des ensemencements dans les milieux utilisés (Matière fécale)	77
Tableau.22	Résultats des activités antibactériennes (Lait maternel).	78
Tableau.23	Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'huile essentielle Romarin (Lait maternel).	78
Tableau.24	Résultats des activités antibactériennes (Matière fécale).	79
Tableau.25	Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'huile essentielle Romarin (Matière fécale).	79

Résumé :

L'objectif du présent travail est de projeter une étude sur la plante *Romarinus officinalis* et son influence sur les femmes et les nouveaux nés afin de comprendre son rôle antibactérien. Pour cela nous avons utilisé la méthode d'extraction d'huile essentielle par entrainement à la vapeur sur la plante *romarinus officinalis*. L'huile essentielle extraite a été utilisée dans notre étude sur le lait maternel et la matière fécale des nouveaux nés. L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques imbibés à l'huile essentielle utilisée. A l'aide d'une règle (mm) nous mesurons les diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque pour effectuer la lecture des résultats. Donc de ce qui précède, l'extrait de l'huile essentielle de la plante *Romarinus officinalis* dans notre cas ne joue pas son rôle inhibiteur au niveau des souches étudiées.

Mots clés : *Romarinus officinalis*, huile essentielle, lait maternel, flore intestinale, activité antibactérienne.

Abstract:

The objective of this work is to project a study on the plant *Romarinus officinalis* and its influence on women and newborns in order to understand its antibacterial role. For this we had used the essential oil extraction method by steam training on the plant *Romarinus officinalis*. The extracted essential oil was used in our study on breast milk and fecal matter of newborns. Antibacterial activity is manifested by the appearance of a halo of inhibition of bacterial growth around the discs soaked in the essential oil used. Using a ruler (mm) we measure the diameters of the inhibition zone around each disc to read the results. Therefore from the above, the essential oil extract from the plant *Romarinus officinalis* in our case does not play its inhibitory role in the strains studied.

Keywords: *Romarinus officinalis*, essential oil, breast milk, digestive flora, Antibacterial activity.

الملخص:

الهدف من هذا العمل هو عرض دراسة على نبات إكليل الجبل وتأثيره على النساء والمواليد الجدد من أجل فهم دوره المضاد للبكتيريا. لهذا استخدمنا طريقة استخراج الزيت العطري عن طريق التدريب بالبخار على نبات إكليل الجبل. تم استخدام الزيت العطري المستخرج في دراستنا على لبن الأم وبراز الأطفال حديثي الولادة. يتجلى النشاط المضاد للبكتيريا من خلال ظهور هالة تثبيط نمو البكتيريا حول الأقراص المشبعة بالزيت العطري المستخدم. باستخدام مسطرة (مم) نقيس أقطار منطقة التثبيط حول كل قرص لقراءة النتائج. لذلك من أعلاه ، فإن استخراج الزيت العطري من نبات إكليل الجبل في حالتنا لا يلعب دوره المثبط فيما يتعلق بالسلالات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: إكليل الجبل ، الزيت العطري ، لبن الأم ، الفلورا المعوية ، النشاط المضاد للبكتيريا