

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie



*Laboratoire de recherche
Antibiotique, Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et Activité
Biologique*

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en sciences biologiques

Option

Biochimie

Présenté par

M^{elle} BENGHENIMA Sara

Thème

**Evaluation de l'activité antimicrobienne de quelques extraits
de *Rubus ulmifolius* de la région de Tlemcen**

Soutenu le 30/06/2020, devant le jury composé de :

Président	Dr. AZZI Rachid	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur	Dr. BOUALI Waffa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. M'HAMED Imane	MCB	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2019/2020

Remerciements

Nos remerciements d'abord à dieu « Allah » le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toute ces années.

J'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à notre encadreur Bouali Waffa, maître de conférences B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Tlemcen pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordé pour réaliser ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame Madjdoub Houria, maître de conférences B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Tlemcen pour son aide et ses conseils avisés sur l'avancement de mon travail.

Je remercie madame M'HAMED Imane maître de conférences B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner cette étude.

Je remercie également Monsieur Azzi Rachid maître de conférences A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Tlemcen d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens à remercier la doctorante BENAÏSSA Asma, l'équipe, et les ingénieurs du Laboratoire de Microbiologie, de biochimie pour leur aide, leur gentillesse et surtout leur compréhension.

Enfin, je n'oublie pas de dire merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour leur sacrifice, leurs conseils et leurs encouragements, et de continuer mes études dans les meilleures conditions.

Que Dieu vous bénisse et vous accorde une longue vie.

A ma grande mère que dieu la protège

A mes sœurs Asma et Naïma, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral

A mes frères Mohammed et Sidahmed pour leur appui et leur encouragement

A ceux qui ont partagés des moments avec moi et ceux que j'aime.

Sara

المخلص

تحتوي المستخلصات الطبيعية من النباتات المستخدمة في الطب التقليدي على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجياً.

توت العليق ينتمي لعائلة الورديات ؛ نبات طبي يستخدم عادة في الجزائر لخصائصه العلاجية.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات (المضاد للبكتيريا والفطريات) لبعض المستخلصات ، الهلام النباتي والميثانوليك الذي تم الحصول عليها من الجزء الهوائي (السيقان والأوراق) للنبات الطبي: توت العليق. ولقد تم اختبار نشاط الهلام النباتي من خلال طريقة انتشار جيدة ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Candida albicans*

أظهر مستخلص الهلام النباتي تأثير مثبط على *Candida albicans*, والبكتيريا جرام سالب مثل *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* و على البكتيريا جرام موجب مثل *Staphylococcus aureus* بتركيز 100 ملغ/مل ، مع مناطق تثبيط من 8 إلى 11 ملم ، بينما لا يوجد تأثير للمستخلص ضد سلالات *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* . في الختام ، فإن مستخلص الهلام النباتي لتوت العليق له نشاط مضاد للميكروبات المسببة للأمراض البشرية.

الكلمات المفتاحية : توت العليق ، النشاط المضاد للمكروبات ، الهلام النباتي.

Résumé

Les extraits naturels issus des plantes utilisées en médecine traditionnelle contiennent une variété des molécules biologiquement actives. *Rubus ulmifolius* appartient à la famille des Rosacées ; une plante médicinale utilisée traditionnellement en Algérie pour leur propriétés thérapeutiques.

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des extraits, mucilages et méthanoliques obtenus à partir de la partie aérienne (tiges et feuilles) de plante médicinale: *Rubus ulmifolius*. L'activité des mucilages a été testée par la méthode de diffusion en puits contre des micro-organismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* et *Candida albicans*.

L'extrait de mucilage a montré un effet inhibiteur sur *Candida albicans*, les bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis* et sur les bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* à une concentration de 100 mg / ml avec des zones d'inhibition de 8 à 11 mm, alors qu'aucun effet de l'extrait contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. En conclusion l'extrait de mucilage de *Rubus ulmifolius* a une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes humains.

Les mots clé : *Rubus ulmifolius*, activité antimicrobienne, mucilage

Abstract

Natural extracts from plants used in traditional medicine contain a variety of biologically active molecules. *Rubus ulmifolius* belongs to the Rosaceae family; a medicinal plant traditionally used in Algeria for their therapeutic properties.

The study aims to evaluate the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal) of extracts, mucilages and methanolics obtained from the aerial part (stems and leaves) of medicinal plant: *Rubus ulmifolius*. The mucilage activity was tested by the well diffusion method against pathogenic microorganism such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Candida albicans*.

Mucilage extract showed inhibition effect on *Candida albicans*, Gram negative bacteria like *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis* and on Gram positive bacteria like *Staphylococcus aureus* at concentration 100 mg/ml with 8 to 11 mm inhibition zones, while no effect of the extract against the *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus subtilis* strains. In conclusion, mucilage extract of *Rubus ulmifolius* has antimicrobial activity against human pathogens.

Keywords: *Rubus ulmifolius*, antimicrobial activity, mucilage.

Liste des abréviations

GGM : galactoglucomannane

TSB : bouillon tryptone soja

GN : gentamicine

S : streptomycine

ATCC : American Type Culture Collection

MH : Mueller-Hinton

Sb : Sabouraud

UFC : Unité Formant Colonies

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Tige et épines de <i>Rubus ulmifolius</i> (Ferrez, 2015)	8
02	Inflorescence de <i>Rubus ulmifolius</i> (Ferrez, 2015)	8
03	Feuille de <i>Rubus ulmifolius</i> (Ferrez, 2015)	8
04	les parties aériennes de <i>Rubus ulmifolius</i> utilisé, a : tiges ; b : feuilles	19
05	Extraction des mucilages par l'éthanol	21
06	Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des mucilages totaux de <i>Rubus ulmifolius</i>	22
07	Extrait méthanolique	23
08	Les différentes étapes de la préparation de l'extrait méthanolique des feuilles et tiges de <i>Rubus ulmifolius</i>	24
09	Solution mère	25
10	Extrait de mucilage total	28
11	Extrait méthanolique sec	29
12	Rendement moyen des extraits de <i>Rubus ulmifolius</i> exprimés en pourcentage et en gramme	30
13	Photo représentative des zones d'inhibition de l'extrait des mucilages par la méthode des disques sur les six bactéries	31
14	Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait des mucilages par la méthode des puits sur les six bactéries	32
15	Photo représentative des zones d'inhibition de l'extrait des mucilages par la méthode des puits sur <i>Candida albicans</i>	33
16	Histogramme représente les zones d'inhibition de l'extrait mucilage vis-à-vis les souches microbiennes pathogènes	34

Liste des tableau

N°	Titre	Page
01	Systématique de <i>Rubus ulmifolius</i> (Boukef, 1986)	9
02	Les microorganismes testés dans l'étude	20
03	Rendement des extraits bruts des parties aériennes (tiges et feuilles) de <i>Rubus ulmifolius</i>	29
04	Aspect et la couleur des extraits de la partie aérienne (tiges et feuilles) de <i>Rubus ulmifolius</i>	29
05	Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations de l'extrait des mucilages par la méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits).	33

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : les plantes médicinales, *Rubus ulmifolius*

1. Les plantes médicinales.....	3
1.1. Généralité.....	3
1.2. Phytothérapie.....	3
2. Mode d'emplois des plantes médicinales.....	3
2.1. Infusion.....	4
2.2. Macération.....	4
2.3. Décoction.....	4
3. Principes actifs des plantes médicinales.....	4
3.1. Métabolites primaires.....	4
3.2. Métabolites secondaires.....	4
3.2.1. Composés phénoliques	
a. Acides phénoliques.....	5
b. Flavonoïdes.....	5
c. Tannins.....	5
3.2.2. Alcaloïdes.....	6
3.2.3. Terpènes.....	6
4. Généralité sur la plante.....	7
4.1. La famille des Rosacées.....	7
4.2. Le genre <i>Rubus</i>	7
4.3. <i>Rubus ulmifolius</i> Schott.....	7
4.3.1. Présentation et origine.....	7
4.3.2. Description.....	8
4.3.3. Nom vernaculaire.....	9
4.3.4. Systématique.....	9
4.3.5. Composition de <i>Rubus ulmifolius</i>	9

4.3.6. Utilisation thérapeutique.....	10
---------------------------------------	----

Chapitre 2 : Mucilage

1. Les polysaccharides.....	11
2. Les mucilages.....	11
2.1. Nature et composition.....	11
2.2. Les polysaccharides dérivés du mannose : « Mucilages neutres ».....	11
2.2.1. Glucomannanes.....	12
2.2.2. Galactomannanes.....	12
2.2.3. Galactoglucomannanes.....	12
3. Utilisation des plantes à mucilage.....	13
4. Activités des polysaccharides de genre <i>Rubus</i>	13

Chapitre 3 : Activité antimicrobienne de *Rubus ulmifolius*

1. Généralité.....	14
2. Activité antimicrobienne.....	14
2.1. Les infections microbiennes.....	14
2.2. Les antibiotiques.....	14
2.3. Modes d'action des antibiotiques.....	15
2.4. La résistance microbienne aux antibiotiques.....	15
2.5. Les souches microbiennes utilisées dans la présente étude.....	16
2.5.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	16
2.5.2. <i>Bacillus cereus</i>	16
2.5.3. <i>Bacillus subtilis</i>	17
2.5.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.5.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.5.6. <i>Salmonella enteritidis</i>	18
2.5.7. <i>Candida albicans</i>	18

Partie II : Expérimentale

Chapitre 4 : Matériel et méthodes

1.	Objectif.....	19
2.	Matériel.....	19
2.1.	Matériel végétal.....	19
2.2.	Microorganismes.....	20
3.	Méthodes.....	21
3.1.	Extraction du mucilage total.....	21
3.2.	Extrait méthanolique.....	23
3.3.	Evaluation de l'activité antimicrobienne des différentes concentrations des extraits de <i>Rubus ulmifolius</i>	24
3.3.1.	Stérilisation du matériel.....	24
3.3.2.	Préparation des dilutions des extraits.....	25
3.3.3.	Préparation des disques.....	25
3.3.4.	Repiquage des souches.....	25
3.3.5.	Antibiotiques et antifongique.....	25
3.3.6.	Préparation des milieux de culture.....	26
3.3.7.	Préparation de l'inoculum.....	26
3.3.8.	Application de la méthode des disques.....	26
3.3.9.	Application de la méthode des puits.....	27

Chapitre 5 : Résultats et discussion

1.	Rendement des extractions.....	28
1.1.	Extrait des mucilages totaux.....	28
1.2.	Extrait méthanolique.....	28
2.	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	30
	Discussion	35
	Conclusion	37
	Références bibliographiques	38

Introduction générale

Les plantes médicinales constituent une source importante de soins de santé dans le monde et la demande mondiale est de plus en croissance. Dans les pays en développement cette demande est non seulement la résultante de l'inaccessibilité des installations modernes de soins de santé et les coûts élevés de la médecine conventionnelle mais aussi de la médecine traditionnelle qui est très souvent considérée comme une méthode de traitement plus appropriée (**Ladoh-Yemeda et al., 2016**).

Malgré les énormes progrès en médecine humaine, les maladies infectieuses causées par des bactéries, des champignons, des virus et des parasites constituent toujours une menace majeure pour la santé publique (**Zampini et al., 2009**). D'ailleurs, les résistances de ces micro-organismes aux antimicrobiens, observées actuellement dans la pratique médicale moderne, constituent un autre grand problème lié au traitement de ces maladies. Elles constituent l'une des menaces de santé les plus sérieuses et peuvent frapper n'importe qui dans le monde. Par conséquent, il est urgent de découvrir de nouveaux agents antimicrobiens qui pourraient, éventuellement, présenter de nouveaux mécanismes d'action.

Étant donné que les plantes utilisées en médecines traditionnelles contiennent des composants antimicrobiens utiles contre les infections et qui peuvent aider dans la lutte contre les maladies infectieuses liées à l'antibiorésistance (**Ngezahayo, 2016**), de nombreux chercheurs dans le domaine de l'ethnopharmacologie se sont concentrés dans les études de ces composés au cours des dernières décennies (**Benbelaïd et al., 2013**).

Le mucilage végétal est un polysaccharide important en pharmacie avec une large gamme d'applications comme des agents épaississants, liants, désintégrant, en suspension, émulsifiants, stabilisants et gélifiants (**Deore et Khadabadi., 2008**). Outre son utilisation dans les médicaments finis, de nouvelles utilisations ont été trouvées dans la préparation de cosmétiques, de textiles et de papier peint (**Shirwaikar et al., 2007**).

Rubus ulmifolius Schott est un arbuste vivace appartient de la famille des Rosacées qui pousse dans un sol sec ou sablonneux. Elle a été largement cultivé en Europe et en Afrique du Nord (**Fazio et al., 2013**). Des études récentes ont révélées que les composés purs, isolés de cette plante tels que l'ursane, les glycosides, les flavonoïdes, exercent une activité antimicrobienne sur plusieurs microorganismes (**Panizzi et al., 2002**).

L'objectif de la présente étude est l'évaluation de l'activité antimicrobienne de quelques extraits, mucilages et méthanoliques de la partie aérienne (tiges et feuilles) de *Rubus ulmifolius*.

Le travail est structuré en cinq chapitres. Les trois premiers sont une synthèse bibliographique comportant une généralité sur les plantes médicinales et les propriétés de la plante *Rubus ulmifolius*, après un aperçu sur les polysaccharides et les mucilages, ensuite une étude de l'activité antimicrobienne de *Rubus ulmifolius*. Les deux autres chapitres comportent le travail expérimental, les résultats obtenus et la discussion. Enfin, la dernière partie concerne la conclusion finale et les perspectives de ce travail.



Partie bibliographique

Chapitre 1

Plantes médicinales, Rubus ulmifolius

1. Les plantes médicinales

1.1. Généralité

Depuis longtemps l'utilisation des plantes médicinales était connue pour améliorer et guérir la santé de l'homme, elles sont exploitées à tous les niveaux, notamment au niveau thérapeutique. Malgré le développement de la chimie de synthèse, l'utilisation des plantes médicinales a conservé une large place du fait de leur efficacité dans diverses procédures thérapeutiques (**Lazli et al., 2018**).

Ces plantes ont une importance tant médicinale comme culturel, et aussi au plan économique pour les pays en développement. Les médicaments à base des plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques (**Jdaidi et Hasnaoui, 2016**).

1.2. Phytothérapie

La phytothérapie est une pratique millénaire basée sur un savoir transmis et enrichi au fil d'innombrables générations. En effet, durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et de génération en génération.

On peut distinguer deux types de phytothérapie; d'une part, une pratique traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes empiriquement ; celle-ci est encore employée massivement dans certains pays du monde, surtout ceux en voie de développement où c'est parfois le seul recours thérapeutique accessible. D'autre part, la pharmacognosie, une pratique basée sur les avancées et les preuves scientifiques recherchant les extraits actifs des plantes et leurs effets, une fois identifiés sont standardisés (**Daoudi et al., 2016**).

2. Mode d'emplois des plantes médicinales

Il existe des techniques très variées pour préparer des remèdes avec des plantes médicinales (**Hans, 2007**). Les trois principes élémentaires de préparation des plantes sont: l'infusion, la décoction, et la macération.

2.1. Infusion

C'est la forme la plus simple de préparation des plantes médicinales, on l'applique généralement aux organes délicats de la plante comme les fleurs, feuilles aromatiques, sommités...

L'infusion permet d'assurer une diffusion optimale des substances volatiles (essences, résines, huiles...). La formule de préparation consiste à verser de l'eau bouillante sur une portion d'organes végétaux : fleurs, feuilles, tiges..., à la manière du thé (**Farid, 2011**).

2.2. Macération

La plante est mise à macérer dans de l'eau à température ambiante ou à une température fixe pendant quelques heures. La macération concerne principalement les plantes dont les principes actifs sont dégradés par la chaleur (**Fleurentin et Hayon, 2016**). S'opère à froid plutôt pour des plantes à gommés et mucilages. Laisser tremper les plantes sèches ou fraîches dans l'eau. Le temps de macération peut aller jusqu'à trois semaines. Une filtration sera nécessaire avant la consommation. Grâce à ces techniques, les principes actifs hydrosolubles sont extraits (**Bertrand, 2010**).

2.3. Décoction

La décoction est une méthode d'extraction consiste à placer la matière végétale ou plantes médicinales dans de l'eau que l'on fait bouillir pendant un temps donné. Les décoctions sont généralement réalisées à partir des racines, d'écorce et de baies, aux quelles, on ajoute parfois des feuilles et des fleurs pour extraire leurs principes actifs (**Iserin, 2001**).

3. Principes actifs des plantes médicinales

3.1. Métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories: **les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques** (**Diallo, 2005**).

3.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans les domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'alimentaire.

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...), tandis que d'autres ont une répartition plus restreinte comme les composés soufrés (Macheix *et al.*, 2005; Najjaa *et al.*, 2011).

3.2.1. Composés phénoliques

a. Acides phénoliques

Ce sont les formes phénoliques les plus simples et ils incluent deux majeurs sous-groupes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Les acides phénoliques sont présents généralement sous forme libre ou liés (Andjelkovic *et al.*, 2006). Les acides hydroxybenzoïques dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1. Ces hydroxyles phénoliques OH peuvent ensuite être méthylés (Škerget *et al.*, 2005). Les dérivés de l'acide cinnamique (acides hydroxycinnamiques) ont une structure de base de type C6-C3. Ils appartiennent à la grande famille des phénylpropanoïdes. Les acides hydroxycinnamiques sont les plus abondants des composés phénoliques simples. Ces acides sont rarement trouvés dans la forme libre, sauf dans les aliments transformés qui ont subi une congélation, stérilisation, ou une fermentation. Les formes liées sont les dérivés glycosylés ou esters de l'acide quinique, acide shikimique, et acide tartrique (Mattila and Hellström, 2007 ; Chira *et al.*, 2008).

b. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels, occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, ils sont responsables de la pigmentation de différentes parties de la plante (Abedini, 2013; Bouakaz, 2006). Ils se trouvent en générale dans toutes les plantes vasculaires, ou ils peuvent être localisés dans divers organes telle que les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs et les fruits (Havsteen, 2002).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune celles-ci partagent un même squelette de base à quinze atome de carbones « 2-phényl-1-benzopyrane » (Nkhili, 2009). Ils possèdent de nombreux vertus médicinales : antioxydant, maintiennent une bonne circulation, propriétés anti-inflammatoires et antivirale etc (Crozier *et al.*, 2006).

c. Tannins

Les tannins sont des composés phénoliques très répandus dans le règne végétal (Cheynier, 2005). Ce sont des molécules fortement hydroxylées ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines, ce qui explique leur capacité à tanner la peau

(Macheix *et al.*, 2005). Ils possèdent diverses activités biologiques. Ce sont des agents antimicrobiens, antibactériens, antiviraux, anti inflammatoires (Awika et Rooney, 2004; Chavan *et al.*, 2001). Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes distincts.

- **Les tannins hydrolysables**

Ils sont constitués par des esters du D-glucose. Ce sont des tannins galliques, on les trouve dans les noix et les framboises, ils sont très répandus dans les plantes (Mueller-Harvey, 2006).

- **les tannins condensés**

Les tannins condensés ou proanthocyanidines sont des antioxydants ayant un fort pouvoir protecteur capable de prévenir certaines maladies cardiovasculaires (Peronny, 2005). La structure des tanins condensés est voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucres (Boudjouref, 2011).

3.2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. (Boutaghane, 2013).

Les alcaloïdes sont utilisés comme anticancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (Iserin *et al.*, 2007).

3.2.3. Terpènes

les terpènes sont des hydrocarbures naturels, ils présentent des structures soit cyclique soit chaîne ouverte, leurs formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont x : est variable en fonction de degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs entre 1 et 8 sauf dans les poly terpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc), la molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (Bezzaz, 2014).

Ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Ils sont synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même par les animaux (Benaïssa, 2011).

4. Généralité sur la plante

4.1. La famille des Rosacées

La rosacée est l'une des familles des plantes les plus importantes sur le plan économique dans les régions tempérées et comprend plus de 100 genres et environ 3000 espèces. Les composés phytochimiques comme les flavonoïdes, et les composés phénoliques présents dans les fruits des rosacées sont des sources majeures de nutrition humaine qui pourraient potentiellement favoriser la santé et avoir des avantages contre les maladies (Akhtar, 2017).

4.2. Le genre *Rubus*

Le genre *Rubus* comprend les mûres, les framboises et leurs hybrides et est communément appelé ronces, il peut se découper en trois sous-genres.

- les framboises avec leurs fruits rouges, recouverts de nombreux poils courts, appelé « sous-genre *Idaeobatus* ».
- le deuxième, c'est le petit *Rubus* qui donne des fruits rouges vifs avec peu de drupéoles (petites boules qui forment le fruit) toutes glabres qui forme à lui seul le « sous-genre *Cylactis* ».
- le dernier, sous-genre des ronces qui donnent comme fruit ce que nous appelons les mûres, c'est le « sous-genre *Rubus* » (Folta et Gardiner, 2009; Hummer, 2010).

4.3. *Rubus ulmifolius* Schott

4.3.1. Présentation et origine

Rubus ulmifolius (*Rosaceae*), connu sous le nom de mûre sauvage ou mûre à feuilles d'orme, est un arbuste vivace trouvé dans les habitats sauvages et cultivés en Europe, en Asie, en Afrique du Nord, et en Amérique du Nord et pousse dans de nombreuses régions du monde, y compris dans des pays d'Amérique du Sud comme le Brésil (Martins *et al.*, 2014). Contrairement à la plupart des espèces européennes, elle est sexuée et présente de ce fait une grande variabilité morphologique (Ferrez, 2019).

Cette espèce produit des mûres comestibles, qui sont de type d'agrégat, globuleux, saveur acidulée et avec une coloration noire en fin de maturation (D'Agostino *et al.*, 2015).

La flore européenne de *Rubus* est principalement constituée de polyploïdes. Le genre *Rubus* comprend plusieurs espèces de baies et est le plus grand genre de la famille des rosacées (Schulz, 2019).

4.3.2. Description

R. ulmifolius est une espèce arbustive sarmenteuse formant des fourrés épineux impénétrables (**fig.1**). Le développement des tiges est biennuel. Seules les tiges de la seconde année donnent au cours de l'été les inflorescences (**fig.2**), produisant ensuite le fruit composé de segments charnus comportant tous une graine (**Masson et al., 2014**). Plante très variable généralement hautement arquée, robuste pouvant structurer des ronciers denses et étendus.

- ❖ **Feuilles (fig. 3)** la plupart à 5 folioles (très rarement à 4 ou 3 folioles) pédalées ou digitées (**Ferrez, 2015**).
- ❖ **Fleurs**, roses souvent profond, et des styles, rougeâtres au moins à la base, sont également diagnostiques (**Ferrez, 2019**). Sépales réfléchis, grise-blanche courtement tomenteux, sans acicule. Pétales de couleur rose-rouge violacé rarement rose pâle ou blanche (**Ferrez, 2015**).



Figure n°1: Tige et épines de *Rubus ulmifolius* (**Ferrez, 2015**)



Figure n°2: Inflorescence de *Rubus ulmifolius* (**Ferrez, 2015**)



Figure n° 3 : Feuille de *Rubus ulmifolius* (**Ferrez, 2015**)

4.3.3. Nom vernaculaire

Nom vernaculaire algérien : Âlaieg (**Ounaissiaet al.,2019**)

Nom français :la ronce (**Lazli et al., 2019**)

Nom anglais : elm-leaf blackberry

Nom espagnol: zarzamora (**Fazio et al., 2013**)

4.3.4. Systématique

Tableau n° 1 : Systématique de *Rubus ulmifolius* (Boukef, 1986).

Règne	Plante
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermatophyta
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Rosales</i>
Famille	<i>Rosaceae</i>
Genre	<i>Rubus</i>
Espèce	<i>Rubus ulmifolius</i>

4.3.5. Composition de *Rubus ulmifolius*

Il a été rapporté que *Rubus ulmifolius* contient des acides phénoliques et des flavonoïdes. Ses principaux composés sont l'acide caféique, l'acide férulique, la quercétine-3-O-glucuronide, le kaempférol-3-O-β-D-glucuronide, l'acide gallique, et le tiliroside (**Panizzi et al., 2002**), et l'acide ellagique (**Martini et al.,2009**). En plus, il contient des acides organiques, de l'acide ascorbique, des huiles volatiles et des tanins (**Wada et Ou, 2002**).

Dans les feuilles de *R. ulmifolius*, le kaempférol 3-O-rutinoside et la naringénine sont des composés phénoliques dominants (**Tabarki et al., 2017**).

4.3.6. Utilisation thérapeutique

Dans les médecines traditionnelles italiennes, *Rubus ulmifolius* a été utilisé pour le traitement des ulcères, abcès, furoncles, yeux rouges, troubles vaginaux, inflammations intestinales, diarrhée et hémorroïdes. *Rubus ulmifolius* est utilisé pour leur activité hypoglycémique et activité antipyrétique (Ali *et al.*, 2017).

Les feuilles de ronce sont très astringentes et peuvent être employées pour traiter les aphtes, fortifier les gencives. En décoction, elles font cesser la diarrhée et calment les hémorroïdes. En tisane ou en gargarisme sont utilisées pour la toux, les maux de gorge et les affections buccales. Egaleme nt en infusion sont préconisées pour leucorrhées, diabète, hémorragies et lithiase. En application externe pour traiter les aphtes gingivites, pharyngites et les plaies (Souilah, 2018).

Chapitre 2

Mucilage

1. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des macromolécules carbohydrates constituées par l'enchaînement linéaire ou ramifié d'un grand nombre de motifs monosaccharidiques connectés par des liaisons de nature glycosidique (**Ret et al., 2019**).

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées ensemble que l'on trouve dans toutes les plantes. Du point de vue de la phytothérapie, les polysaccharides les plus importants sont les mucilages «visqueux » et les gommages, présents dans les racines, les feuilles et les graines (**Iserin, 2001**).

2. Les mucilages

Les mucilages sont des polymères complexes de nature glucidiques, avec une structure chimique fortement ramifiée (**Sepúlveda et al., 2007**). C'est une matière épaisse et gommeuse, possédant des propriétés tensio-actives uniques dans l'eau qui lui donne la capacité de précipiter des particules et des ions à partir de solutions aqueuses (**Sáenz et al., 2004**).

2.1. Nature et composition

Mucilage est une substance qui se retrouve dans la majorité des plantes. Sa principale caractéristique est qu'elle forme un gel en présence d'eau. Elle se trouve en surface des graines qui en contiennent, dans l'apoplasme des cellules épidermiques. Elle comporte principalement des polysaccharides, avec des chaînes neutres et acides. Les chaînes acides comportent des acides uroniques et peuvent s'apparenter à de la pectine. Concernant les graines oléoprotéagineuses, le lin est l'espèce la plus documentée (**Fabre, 2019**).

Les polymères constitutifs des mucilages sont en général des xylanes ou des dérivés pectiques et renferment le plus souvent des oses neutres (xylose, arabinose, galactose, rhamnose,...) et des acides uroniques (acide galacturonique, acide glucuronique) (**Delattre, 2005**).

2.2. Les polysaccharides dérivés du mannose : « Mucilages neutres »

En tant que monosaccharide bioactif naturel, le D- mannose est un épimère C-2 du glucose, et un complément alimentaire nutritionnel bénéfique pour la santé humaine. (**Zhang et al., 2017**).

Les polysaccharides de mannane se trouvent dans les parois cellulaires de la plupart des plantes et peuvent également servir de polysaccharide de stockage chez certaines espèces (Bååth *et al.*, 2018).

2.2.1. Glucomannanes

Les glucomannanes sont des polysaccharides de la famille des mannanes, très abondant dans la nature, en particulier dans les résineux (hémicellulose), les racines, les tubercules...

Glucomanane est un polysaccharide hydrocolloïdal composé de monomères D-mannose et D-glucose liés en β (1 \rightarrow 4) (Alonso-Sande *et al.*, 2009).

2.2.2. Galactomannanes

Les galactomannanes (GM) sont des polysaccharides hydrosolubles et neutres, isolés de l'endosperme de graines d'environ 70 espèces de légumineuses. Ils sont formés d'une longue chaîne de 1000-1500 unités de mannose, linéaire. Ils présentent une structure primaire similaire consistant en une chaîne principale d'unités de β -D-mannopyranose liées en (1 \rightarrow 4) avec des ramifications d'unité α -D-galactopyranose liée en (1 \rightarrow 6) à la chaîne principale de mannane.

Parmi les galactomannanes les plus connus et les plus commercialisés, on peut citer la gomme de caroube (*Ceratonia siliqua* L.), la gomme de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) (Dakia *et al.*, 2010).

2.2.3. Galactoglucomannanes

Les galactoglucomannanes (GGM) sont des hétéropolysaccharides de la paroi cellulaire végétale, c'est-à-dire des hémicelluloses, avec une structure glucidique similaire à celle des hydrocolloïdes connus: la gomme de guar galactomannan, la gomme de caroube galactomannan et le konjac glucomannan (Valoppi *et al.*, 2019).

Le GGM est composé de motifs D-mannopyranosyl et D-glucoopyranosyl liés en β - (1 \rightarrow 4) partiellement acétylés substitués par des résidus D-galactopyranosyl liés en α - (1 \rightarrow 6). En moyenne, une unité acétyle remplace par 3 à 4 unités hexose en position C-2 et C-3 (Bhattarai *et al.*, 2020).

3. Utilisation des plantes à mucilage

- ❖ Les plantes médicinales à mucilages sont utilisées contre La constipation, mais également pour apaiser les muqueuses enflammées de la bouche et de la gorge surtout sur les inflammations d'origine infectieuses pour lutter contre les bactéries et les autres causes de la maladie (**Hensel, 2008**).
- ❖ Elles peuvent être utilisées pour calmer et protéger les tissus enflammés (par exemple quand la peau est sèche et irritée ou la paroi des intestins est enflammée et douloureuse).
- ❖ Certains polysaccharides, comme les glucomannanes et les pectines, sont utilisés en cosmétologie (**Teuscher et al., 2005**).
- ❖ Les mucilages sont utilisés souvent dans la fabrication des médicaments, pour diminuer l'action irritante de ces derniers, pour corriger le goût ou encore pour empêcher la résorption trop rapide (**Ignat, 2012 ; Youmbai, 2015**).
- ❖ Dans l'industrie alimentaire, le mucilage est appliqué dans la préparation des sauces, gelées, pâtisseries.... (**Jani et al., 2009**).

La meilleure façon de préparer les herbes mucilagineuses comme l'orme rouge (*Ulmus rubra*) et le lin (*Linum usitatissimum*) est de les gorger d'eau froide et faire macérer (**Iserin et al., 2007**).

4. Activités des polysaccharides de genre *Rubus*

Les polysaccharides ont attirés beaucoup d'attention en raison de leur toxicité relativement faible et de leur large spectre de propriétés thérapeutiques.

Les chercheurs ont réussi à isoler des polysaccharides de *R. fruticosus*, *R. idaeus* et *R. chingii*; et ils ont été caractérisés la structure des polysaccharides de *R. crataegifolius* (**Zhang et al., 2015**).

Sahragard et Jahanbin (2017) montrent que les polysaccharides de *Rubus anatolicus* contiennent des composés bioactifs qui ont une activité antioxydante, anticancéreuse, antibactérienne immunologique, anti-tumorale, anti-inflammatoire et hypoglycémique.

Selon **Zang et al. (2015)**, Les résultats ont montré que toutes les bioactivités testées (antioxydant, anti-inflammatoire, anticancéreux) des polysaccharides de feuille de *Rubus chingii* Hu étaient meilleures que celles des polysaccharides de fruit.

Chapitre 3

*Activité antimicrobienne de *Rubus ulmifolius**

1. Généralité

Rubus ulmifolius, (*Rosaceae*) est un arbuste sauvage originaire de la Méditerranée, il a été utilisé en médecine traditionnelle pour ses effets bénéfiques. Les feuilles de mûre ont été utilisées pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antivirales et antimicrobiennes, ainsi que leur activité antiproliférative contre les cellules cancéreuses (**Martini et al., 2009**).

En Italie comme dans le Nord-est de l'Algérie, la ronce est utilisée pour le traitement des affections cutanées, précisément les brûlures. Les tanins, flavonoïdes et polyphénols (acide caféique) sont peut être responsables des propriétés cicatrisantes de *Rubus ulmifolius* Schott (**Manca et al., 2014**).

Les extraits de plante constituent des sources importantes des composés biologiquement actifs qui peuvent présenter des propriétés antimicrobiennes importantes (**Martini et al., 2009**).

2. Activité antimicrobienne

2.1. Les infections microbiennes

Certains microorganismes sont capables de moduler le système immunitaire de leur hôte, ce qui peut influencer positivement ou négativement le développement et la progression de maladies inflammatoires d'origines infectieuses et auto-immunes (**Hassan, 2019**).

Les infections bactériennes sont principalement liées à la capacité des bactéries d'envahir et de se propager à travers leurs hôtes en utilisant différents types de motilité, en libérant une myriade de facteurs de virulence, en construisant un biofilm structuré qui conduit à des dommages aux cellules et aux tissus de l'hôte, mais permet également aux bactéries de se soustraire le système immunitaire et les agents antimicrobiens conventionnels (**Carette et al., 2020**).

2.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes. Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été

structuralement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Boughachiche, 2012**).

2.3. Modes d'action des antibiotiques

❖ Action sur la paroi bactérienne

La plupart des antibiotiques agissant sur la paroi des bactéries sont en réalité des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, ce qui rend la paroi bactérienne plus fragile. Ils sont donc des antibiotiques bactéricides (**Soualmia et Benchahla, 2018**).

❖ Action sur la synthèse des protéines

Le ribosome est l'une des cibles d'action des antibiotiques comme les aminosides, les macrolides, et les tétracyclines. L'inhibition de l'action des ribosomes bactériens permet de perturber la synthèse protéique (**Bush, 2012; Becker et Cooper, 2013**).

❖ Action sur la membrane cytoplasmique

La Daptomycine dépoliarise la membrane dépendante du calcium, ce qui conduit à la cessation de la synthèse macromoléculaire et perturbation de la membrane cellulaire chez les bactéries, et les polymyxines provoquent la désintégration de la membrane cellulaire bactérienne en se liant efficacement au fragment lipidique du lipopolysaccharide dans la cellule bactérienne (**Yao, 2019**).

❖ Action sur la biosynthèse des acides nucléiques

Les antibiotiques qui agissent au niveau des acides nucléiques sont toxiques pour toutes les cellules. La molécule de novobiocine (glycoside) inhibe la réplication de l'ADN et la rifamycine (ansamycine) bloque la synthèse de l'ARNm par inhibition de l'ARN polymérase bactérienne (**Kieser et al., 2000 ; Tortora et al., 2003**).

2.4. La résistance microbienne aux antibiotiques

L'émergence et la diffusion des résistances aux antibiotiques représentent une réelle menace pour la santé publique mondiale (**Ouedraogo et al., 2017**).

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel chez les bactéries face aux antibiotiques qui se définit comme étant la capacité que possède une bactérie à continuer sa croissance ou à survivre en présence de l'antibiotique. Cette résistance provient de l'absence de cible de l'antibiotique sur une bactérie, de la sélection ou de l'acquisition de compétences de résistance portées par des fragments de matériel génétique. (Lévi, 2006; Sabtu *et al.*, 2015).

2.5. Les souches microbiennes utilisées dans la présente étude

2.5.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli est une bactérie en forme de bâtonnet à Gram négatif, Les souches de Commensal *E. coli* sont des membres du microbiote naturel anaérobie facultatif des humains et des animaux.

Cette bactérie est généralement inoffensive, elle est très répandue dans la microflore intestinale d'individus en bonne santé, mais une partie de sa population peut devenir pathogène et provoquer une maladie lorsqu'elle est directement inoculé dans des sites extra-intestinaux (Ji *et al.*, 2020).

2.5.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus appartient à un genre de bactéries Gram positif, formant des endospores et anaérobies facultatives. La résistance de ses spores à un certain nombre de conditions défavorables a entraîné une large distribution de l'organisme. Elle se trouve généralement dans l'air, le sol et de l'eau, ainsi que des matières animales et végétales.

B. Cereus est généralement une espèce mésophile poussant dans la plage de température 10 à 50 ° C. En plus de causer des maladies gastro-intestinales, *B. cereus* est un pathogène oculaire virulent et elle est responsable de la conjonctivite, de la panophtalmite, de la kératite, de l'iridocyclite et de l'abcès orbital. Elle peut provoquer un certain nombre d'autres infections opportunistes, notamment des infections des voies respiratoires et des infections des plaies (Griffiths *et al.*, 2017).

2.5.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) est une bactérie modèle à Gram positif dans la recherche sur les biofilms, elle est capable de former un biofilm de type colonie morphologiquement complexe et exceptionnellement robuste, Cette bactérie est considérée comme largement non pathogène, bien qu'elle est étée liée à la détérioration des aliments.

B. subtilis réside généralement en association avec les racines des plantes dans le sol ainsi que dans la cavité buccale humaine et le tractus gastro-intestinal. En outre, elle présente une capacité à résister à des conditions environnementales sévères avec sa capacité à sporuler, en particulier en formant des endospores dormantes qui sont intégrées dans le biofilm (**Gingichashvili et al., 2020**).

2.5.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif aérobie stricte, ubiquitaire, saprophyte et naturellement résistante aux antibiotiques (**Mérens et al., 2013**).

C'est un pathogène humain opportuniste, capable de provoquer un large éventail d'infections aiguës et chroniques qui sont souvent difficiles à traiter, et potentiellement mortelles, en raison de sa récalcitrance aux antimicrobiens et aux facteurs immunitaires de l'hôte. Cette tolérance peut être attribuée à sa capacité à former des communautés protectrices appelées biofilms (**Khosravi et al., 2016; Pestrak et al., 2020**).

P. aeruginosa est l'une des causes les plus courantes d'infections nosocomiales qui affecte principalement les patients hospitalisés immunodéprimés (**Khosravi et al., 2016**).

2.5.5. *Staphylococcus aureus*

Ce sont des cocci à Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non sporulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *S. aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires des blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire (**Dworkin, 2006**).

S. aureus peut exprimer un large éventail de facteurs de virulence, y compris des protéines de surface qui sont attachées de manière covalente au peptidoglycane. Ces

protéines de surface sont cruciales pour le succès de l'organisme en tant que bactérie commensale et en tant qu'agent pathogène (**Foster et al., 2014**).

2.5.6. *Salmonella enteritidis*

Salmonella enteritidis est une des principales causes de salmonellose dans le monde, et plus de 80% des foyers enquêtés en Europe ont été associés à la consommation d'œufs mal cuits ou d'aliments contenant des œufs non cuits (**Tang et al., 2019**).

Salmonella enteritidis est un bacille à coloration Gram négatif, non sporulant, la plupart du temps doués d'une mobilité propre grâce au flagelle péritriche. La taille des bâtonnets varie entre 2 et 5 µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur.

S. enteritidis est aéro-anaérobies, réduis le nitrate en nitrite, peut utiliser le citrate comme seule source de carbone, et fermente le glucose (**Korsak et al., 2004**).

2.5.7. *Candida albicans*

Candida albicans est le principal agent pathogène fongique opportuniste, les plus courants chez l'homme. Il se trouve comme commensal dans le tractus gastro-intestinal humain, et il est responsable d'une grande variété d'infections muqueuses telles que le muguet buccal et vaginal (**Carlisle et al., 2009**). Bien que l'infection superficielle de *C. albicans* ne soit pas mortelle, les infections systémiques peuvent entraîner une mortalité pouvant atteindre 50%. De plus, la fréquence de résistance aux antifongiques chez *C. albicans* augmente dans le monde.

C. albicans est dimorphe et présente une virulence liée à sa capacité de subir une transition morphologique réversible des cellules de levure simples aux filaments pseudohyphales et hyphales (cellules allongées attachées bout à bout) (**Delavy et al., 2020; Hogan et al., 2004**), qui pousse sous forme de levure à 30 ° C et sous forme filamenteuse ou hyphale à 37 ° C. Sur la couche cornée de la peau, *C. albicans* existe sous forme de levures en herbe. Le *C. albicans* pathogène dans le derme et les organes systémiques existe principalement sous forme de pseudo-hyphes (**Gow et al., 2012**).

Partie expérimentale

Chapitre 4

Matériel et méthodes

1. Objectif

Le travail expérimental que nous avons réalisé a été effectué au sein du laboratoire de Biochimie et de Microbiologie de la faculté des Sciences de la nature et de vie de l'université de Abou-Bekr Belkaid Tlemcen durant la période de Février et Mars de l'année 2020.

L'objectif de cette étude est de tester *in vitro* l'activité antimicrobienne de deux extraits (méthanolique et mucilage) de la partie aérienne (feuilles et tiges) de *Rubus ulmifolius* Shott récolté dans la région de Tlemcen et préparé à différentes concentrations vis-à-vis de six germes bactériennes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) et une levure (*Candida albicans*)

2. Matériel

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de feuilles et tiges de la plante *Rubus ulmifolius*, récoltée durant le mois de Février 2020 dans la région d'Ainfezza de la willaya de Tlemcen.

Après la récolte, le matériel végétal est séché à l'air libre à l'ombre pendant une semaine. Il est été ensuite réduit en poudre à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue est tamisée et stockée dans des boites étanches pour utilisation en cas de besoin pour les différents tests chimiques.



Figure n°4 : les parties aériennes de *Rubus ulmifolius* utilisé, **a** : tiges ; **b** : feuilles

2.2. Microorganismes

Six souches bactériennes et une souche de levure de références ont été utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne de l'extrait des mucilages et méthanolique. Les souches proviennent toutes du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, Au Biomédical et à l'Environnement (**LAMAABE**). Les souches sont représentées dans le tableau 02.

Tableau n°2 : les microorganismes testés

Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27835 <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 2453

Ces espèces bactériennes ont été choisi parce qu'elles représentent les espèces à Gram positif et à Gram négatif les plus communes, responsables d'infections nosocomiales et résistantes aux antibiotiques.

La revivification des différentes espèces bactériennes est faite par passage successif sur bouillon nutritif et sur gélose nutritive.

3. Méthodes

3.1. Extraction du mucilage total

Avant l'extraction, le matériel végétal est traité par le chloroforme pour éliminer la chlorophylle.

L'extraction se fait selon la méthode décrite par **Jasiem *et al.* (2016)** avec modification où il faut :

- Mélanger 20g du matériel végétal avec 200ml d'eau distillée dans un ballon rodé surmonté d'un réfrigérant et en présence de 2 à 3 pierres de ponce pour réguler la température intérieure.
- Laisser le mélange bouillir pendant 1 heure.
- Laisser le mélange se refroidir pendant 2 heures.
- Filtrer le mélange sur une mousseline et récupérer le filtrat.
- Ajouter 200ml d'éthanol froid à 200ml de filtrat. L'éthanol permet de précipiter les mucilages. Ce mélange est mis au froid (4°C) pendant 24 heures.
- Centrifugé le mélange à 3500 tours/min pendant 5 min afin de récupérer le culot.
- Sécher le culot à 50 °C.
- La poudre obtenue est l'extrait des mucilages totaux.

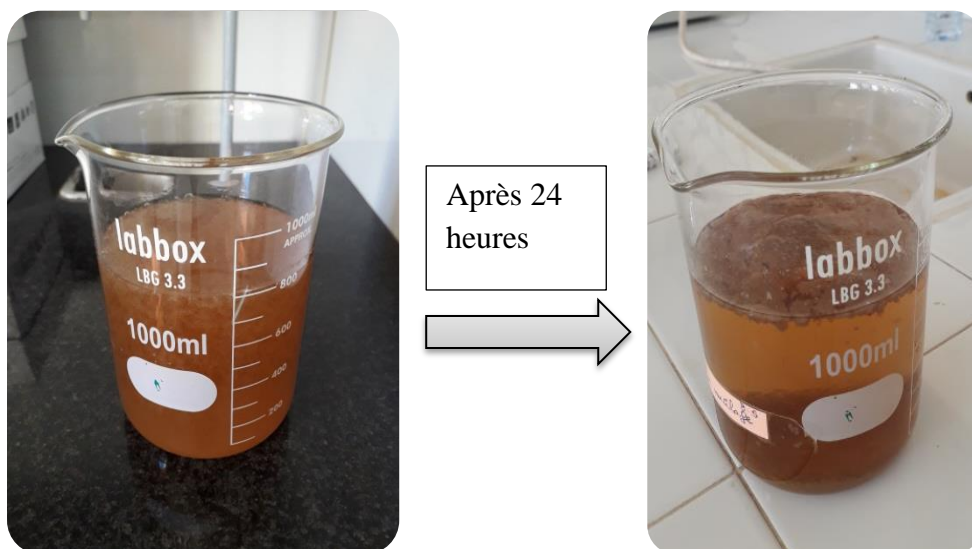


Figure n°5 : Extraction des mucilages par l'éthanol

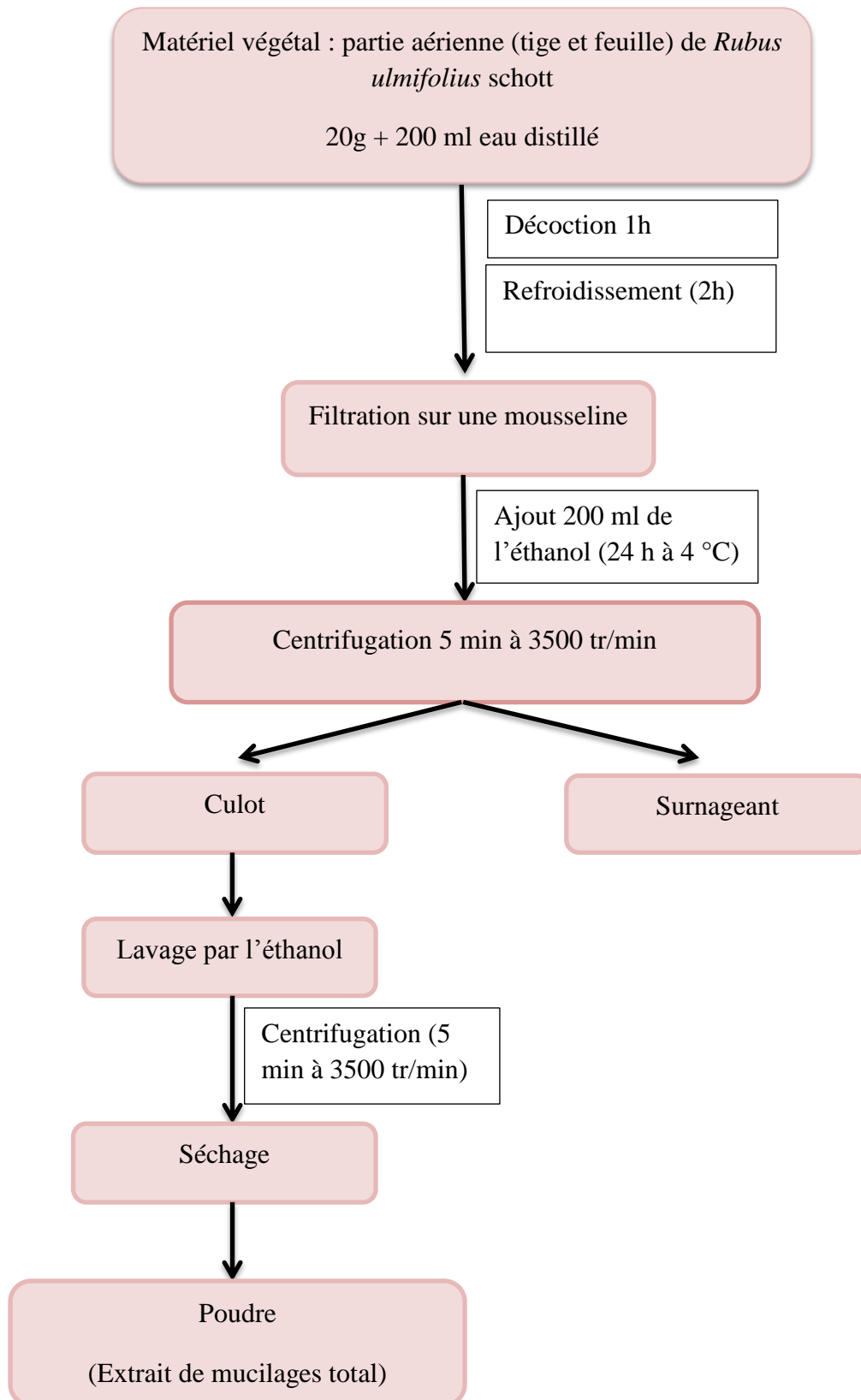


Figure n°6 : Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des mucilages totaux de *Rubus ulmifolius*

3.2. Extrait méthanolique

L'extraction se fait selon la méthode décrite par **Hajaji *et al.* (2017)**

- Ajouter 20 g de partie aérienne (feuilles et tiges) en poudre a été mise à macérer dans 100 ml de méthanol, avec trois lavages de 100 ml
- Incuber le mélange à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 24 heures
- Filtrer le mélange sur un papier Whatman
- Evaporer l'extrait à sec sous pression réduite à 50 °C grâce à un évaporateur rotatif pour obtenir un extrait sec.
- Sécher l'extrait dans l'étuve pendant 24 heures à 50 °C et conserver dans des flacons sombres à + 4 °C jusqu'à utilisation

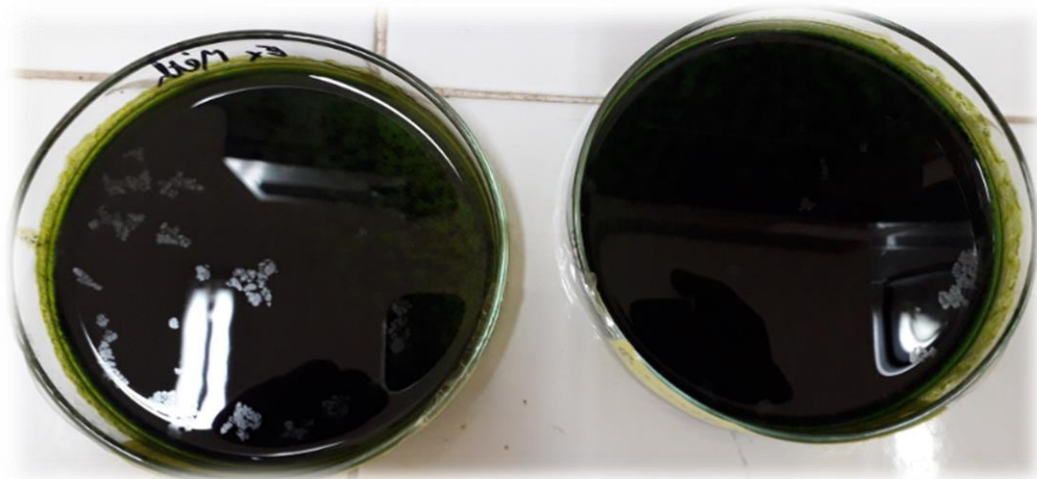


Figure n°7: Extrait méthanolique

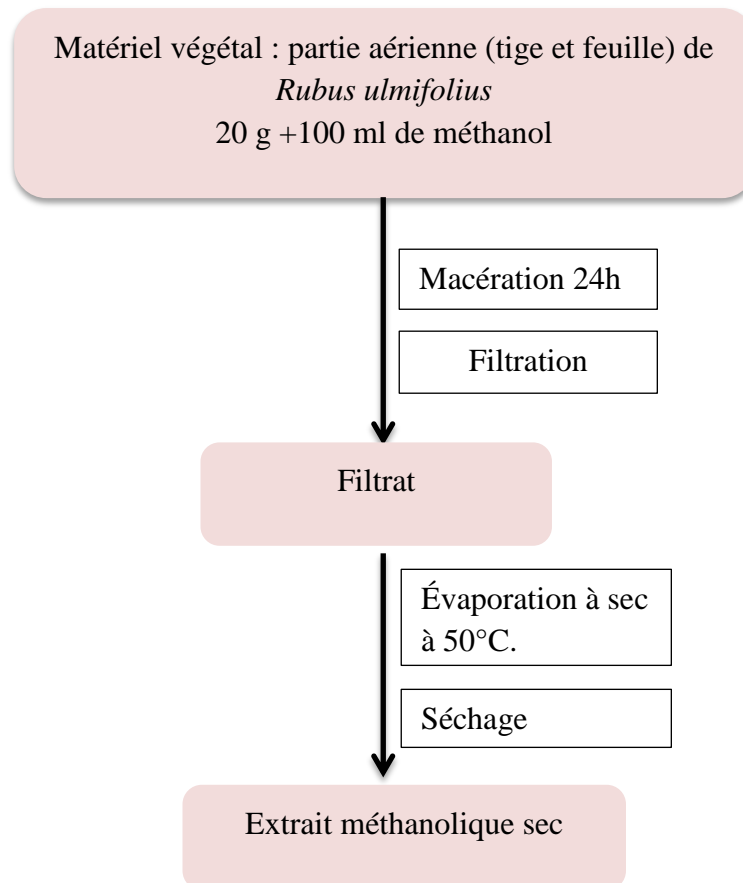


Figure n°8 : les différentes étapes de la préparation de l'extrait méthanolique des feuilles et tiges de *Rubus ulmifolius*

3.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différentes concentrations des extraits de *Rubus ulmifolius*

L'activité antimicrobienne des extraits des mucilages de *Rubus ulmifolius* vis-à-vis les microorganismes (bactéries et levure) est évaluée par :

- Méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques)
- Méthode des puits

3.3.1 Stérilisation du matériel

L'eau distillée, embouts de micropipette, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés pour la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Whatman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3.3.2 Préparation des dilutions des extraits

L'extrait des mucilages a été dissout dans l'eau distillé pour obtenir une solution mère de 100 mg/ml. Deux dilutions ont été préparées 1/2 et 1/10.



Figure n°9 : solution mère

3.3.3 Préparation des disques

La préparation des disques se fait à partir du papier Whatman qui est découpé en disques de 6 mm de diamètre. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques, une fois préparés, sont autoclavés pendant 20 mn à 121°C. Chaque disque est chargé de 10µl de l'extrait à deux concentrations différentes 100 mg/ml et 25 mg/ml.

3.3.4 Repiquage des souches

Les souches (bactéries et levure) à tester ont été repiquées par la méthode des stries dans des boites de Pétri contenant de la gélose nutritive et dans des tubes contenant le TSB pour les bactéries et bouillon Sabouraud (BS) pour la levure *Candida* puis incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées.

3.3.5 Antibiotiques et antifongique

Les antibiotiques utilisés dans notre étude est la Gentamicine (GN) et Streptomycine (S) ont une charge de 10µg/disque. Notre choix s'est porté sur GN et S vu qu'ils possèdent un large spectre d'action, à la fois actif sur les Gram positif et sur les Gram négatif, permettant

ainsi de déterminer la sensibilité de toute la gamme de bactéries étudiées vis-à-vis de ces antibiotiques (Goetting *et al.*, 2011). Et un antifongique Amphotéricine B a une charge de 20µg/disque.

3.3.6 Préparation des milieux de culture

La gélose de Muller Hinton et de Sabouraud sont préparés à partir des milieux de cultures déshydratés, on ajoute la quantité nécessaire de milieu (poudre) dans Erlenmeyer contenant de l'eau distillé, puis agiter et déposer le tout sur plaque chauffant. Après ils sont coulées et répartie dans des boîtes de Pétri stériles. Ces dernières sont séchées pendant 30 min à une température ambiante avant leur emploi.

3.3.7 Préparation de l'inoculum

La standardisation de l'inoculum des microorganismes test est une étape importante pour la reproductibilité des tests. La suspension microbienne est homogénéisée à l'aide d'un vortex et sa turbidité est ajustée à 0,5 Mac Farland, soit une densité optique égale à 0,08 à 0,10 (10^8 UFC/ml) à une longueur d'onde de 580 nm, l'inoculum de la levure avait une densité optique entre 0,12 et 0,15 à une longueur d'onde de 530 nm.

Ajuster la suspension en ajoutant du milieu si la valeur est supérieure à la limite minimale ou en ajoutant des colonies si elle est inférieure à la limite maximale (Gachkar *et al.*, 2007; Houekou *et al.*, 2016).

3.3.8 Application de la méthode des disques

Nous avons utilisé milieu Muller- Hinton pour l'activité antibactérienne et milieu Sabouraud pour l'activité antifongique. À partir de l'inoculum préparé, une suspension a été utilisée pour ensemercer des boîtes de Pétri par écouvillonnage (afin d'obtenir un tapis), après on laisse les boîtes sécher pendant quelques minutes, un disque de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre imbibé avec 10 µL de l'extrait des mucilages est déposé, un disque imbibé de 10µL d'eau distillé stérile est utilisé comme témoin négatif, deux antibiotiques Streptomycine et Gentamicine (pour les bactéries) et un antifongique Amphotéricine B (pour les levures) sont utilisés comme témoin positif sur la même boîte.

Les boîtes sont laissées une heure à température ambiante pour permettre la diffusion de l'extrait, puis elles sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et 48 h

pour les levures. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres à l'aide d'une règle, disque inclus (Chebaibi *et al.*, 2016; Haddouchi *et al.*, 2016).

3.3.9 Application de la méthode des puits

Après la standardisation de l'inoculum microbien. L'ensemencement par écouvillonnage de l'inoculum est réalisé en surface du milieu Mueller Hinton (pour les bactéries) et du milieu Sabouraud (pour les levures) préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Après 15 mn, des puits ont été perforés à l'aide de pipettes Pasteur (l'extrémité épaisse de 6 mm).

Ensuite 30µl de l'extrait de mucilage est distribuée dans chaque puits à deux concentrations différentes de 100mg/ml et de 100µg/ml. Un puit est rempli d'eau distillé stérile est utilisé comme contrôle négatif, Streptomycine, Gentamicine (pour les bactéries) Amphotéricine B (pour les levures) sont utilisés comme contrôle positif sur la même boîte.

Les boîtes ont été ensuite laissées à la température ambiante pendant 1 heure pour la pré-diffusion puis incubées à 37°C pendant 24 heures (pour les bactéries) et 48 heures (pour les levures). L'activité antibactérienne a été estimée par la mesure à la règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition autour des puits (Houekou *et al.*, 2016).

Chapitre 5

Résultats et discussion

1. Rendement des extractions

1.1. Extrait des mucilages totaux

L'ajout de l'éthanol au décocté aqueux a permis aux mucilages de se précipiter. Après centrifugation et séchage, un extrait de mucilage de couleur marron a été obtenu (**fig.10**).

Le rendement en extrait total est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par la formule :

$$R (\%) = (M^* / M) \times 100$$

R : Rendement en %,

M* : Poids de l'extrait total des mucilages,

M : Poids de la matière végétal sec.



Figure n°10 : Extrait de mucilage total

1.2. Extrait méthanolique

Le rendement de l'extrait méthanolique a été quantifié selon la même formule précédente en pourcentage à partir de 20 g du matériel végétal de la partie aérienne de *Rubus ulmifolius*.



Figure n° 11 : Extrait méthanolique sec

Les résultats obtenus de rendement et l'aspect des extraits sont représentés dans les tableaux suivant :

Tableau n°3: Rendement des extraits bruts des parties aériennes (tiges et feuilles) de *Rubus ulmifolius*

	Extrait de mucilage	Extrait méthanolique
Poids de l'extrait (g)	0,92	3,81
Pourcentage de l'extrait (%)	4,6	19,05

Tableau n°4 : L'aspect et la couleur des extraits des parties aériennes (tiges et feuilles) de *Rubus ulmifolius*

	Extrait de mucilage	Extrait méthanolique
Aspect	Solide (poudre)	Solide
Couleur	Marron clair	Marron foncé

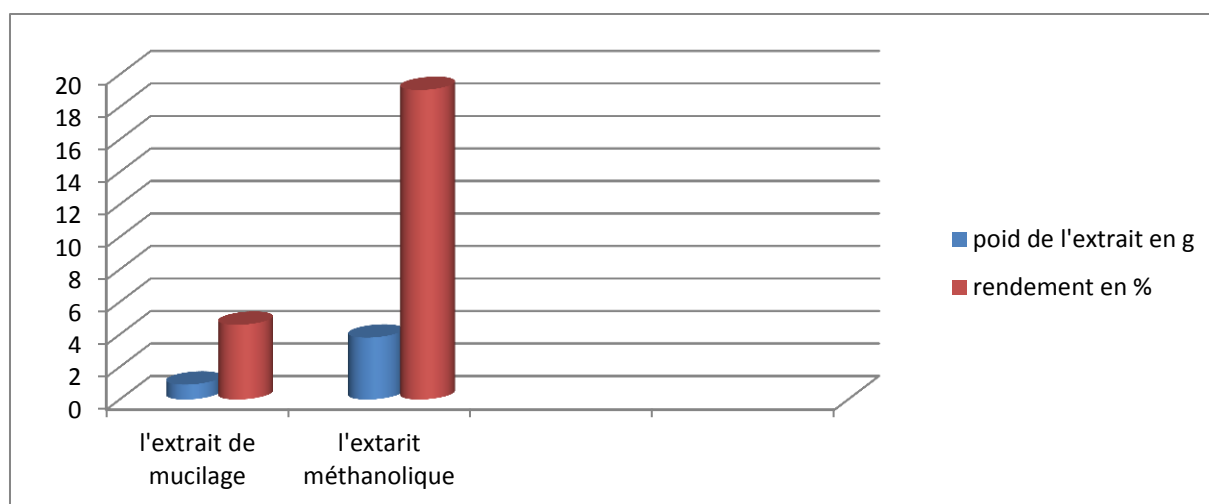


Figure n° 12 : Rendement moyen des extraits de *Rubus ulmifolius* exprimés en pourcentage et en gramme

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique (par rapport au poids de la poudre) a donné un meilleur rendement, par rapport à l'extrait de mucilage qui est moins élevé.

Les résultats de (tableau n°5) montrent que les mucilages et l'extrait méthanolique de *Rubus ulmifolius* ont un aspect solide, avec une couleur marron clair et marron foncé respectivement.

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des mucilages isolés de la plante *Rubus ulmifolius* par la méthode de diffusion des disques et la méthode des puits sur un milieu gélosé.

L'activité antimicrobienne est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques et autour des puits contenant l'extrait à tester vis-à-vis de sept germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* et *Candida albicans*).

Après 24 h d'incubation à une température de 37°C pour les germes bactériens et de 48 h pour les levures. Les résultats qui se présentent ci-après montrent que la méthode des disques n'a donné aucun résultat. Donc on utilise la méthode des puits pour évaluer l'activité antimicrobienne.

L'extrait des mucilages a une activité antimicrobienne de degrés variables contre les souches des différents micro-organismes testés. Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits ont été mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 8 mm (puits de 6 mm est incluse) (Tabak, 2007).

Les résultats présentent dans les figures et le tableau suivant :

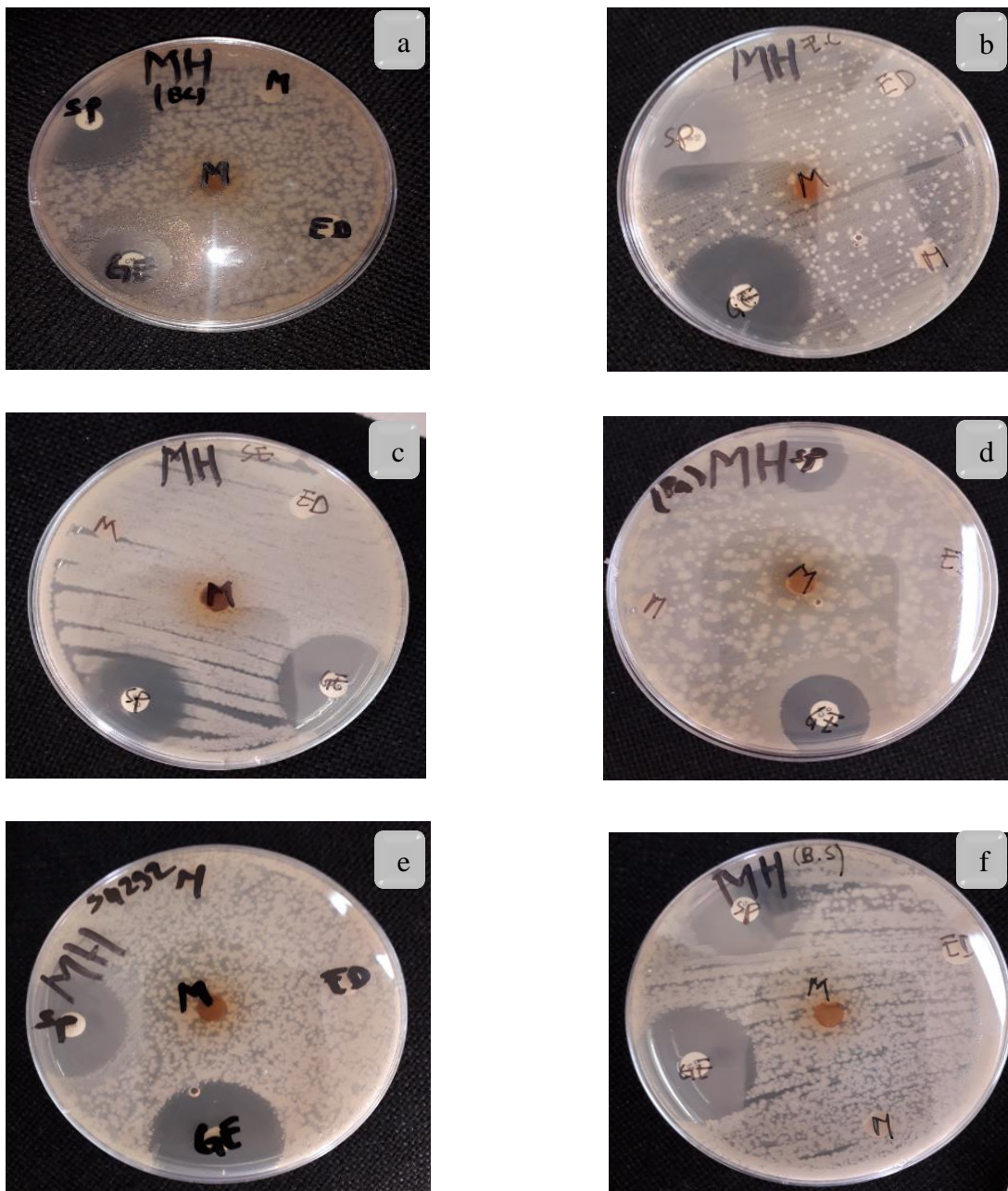


Figure n°13 : Photo représentative des zones d'inhibition de l'extrait des mucilages par la méthode des disques sur : **a** : *Bacillus cereus*, **b** : *Escherichia coli*, **c** : *Salmonella enteritidis*, **d** : *Pseudomonas aeruginosa*, **e** : *Staphylococcus aureus*, **f** : *Bacillus subtilis*

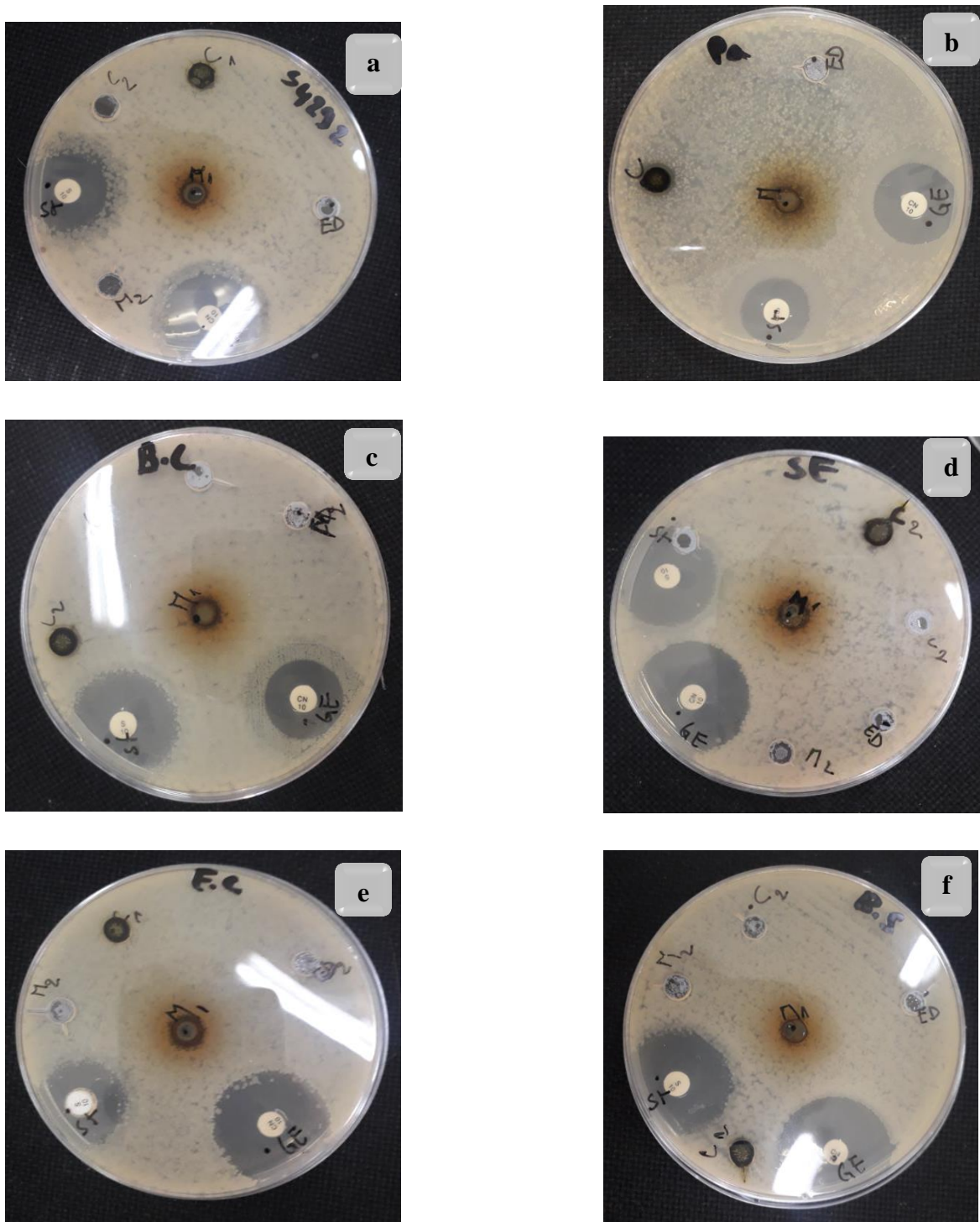


Figure n°14: Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait des mucilages par la méthode des puits sur : **a** : *Staphylococcus aureus*, **b** : *Pseudomonas aeruginosa*, **c** : *Bacillus cereus*, **d** : *Salmonella enteritidis*, **e** : *Escherichia coli*, **f** : *Bacillus subtilis*

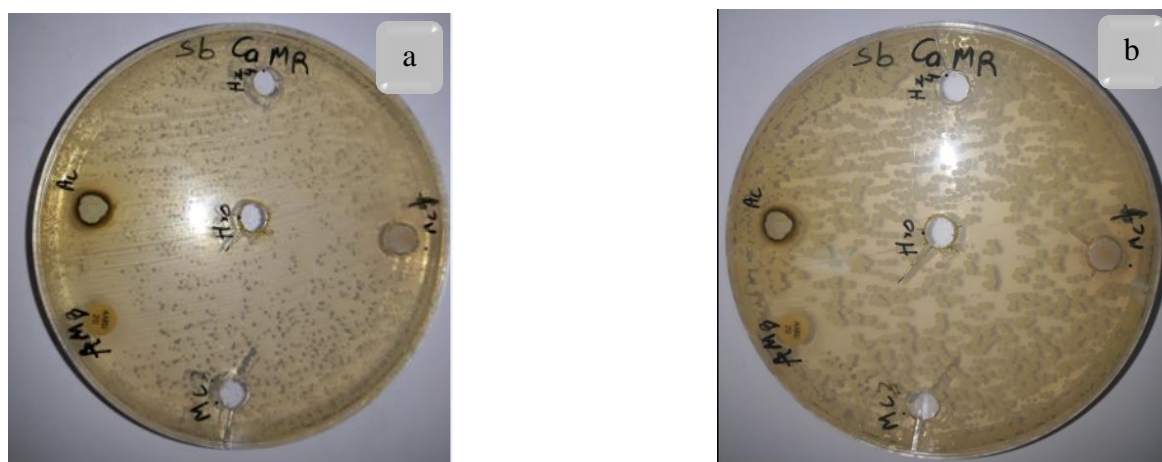


Figure n°15 : Photo représentative des zones d'inhibition de l'extrait des mucilages par la méthode des puits sur *Candida albicans* ; **a** : après 24 h d'incubation, **b** : après 48 h d'incubation

Tableau n°5 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations de l'extrait des mucilages par la méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits).

Diamètre des zones d'inhibition / Microorganismes	Concentration de 100 mg/ml	Concentration de 100 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27835	0,0	0,0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	7,0	0,0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 2453	8,0	0,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,0	0,0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,0	0,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11	0,0

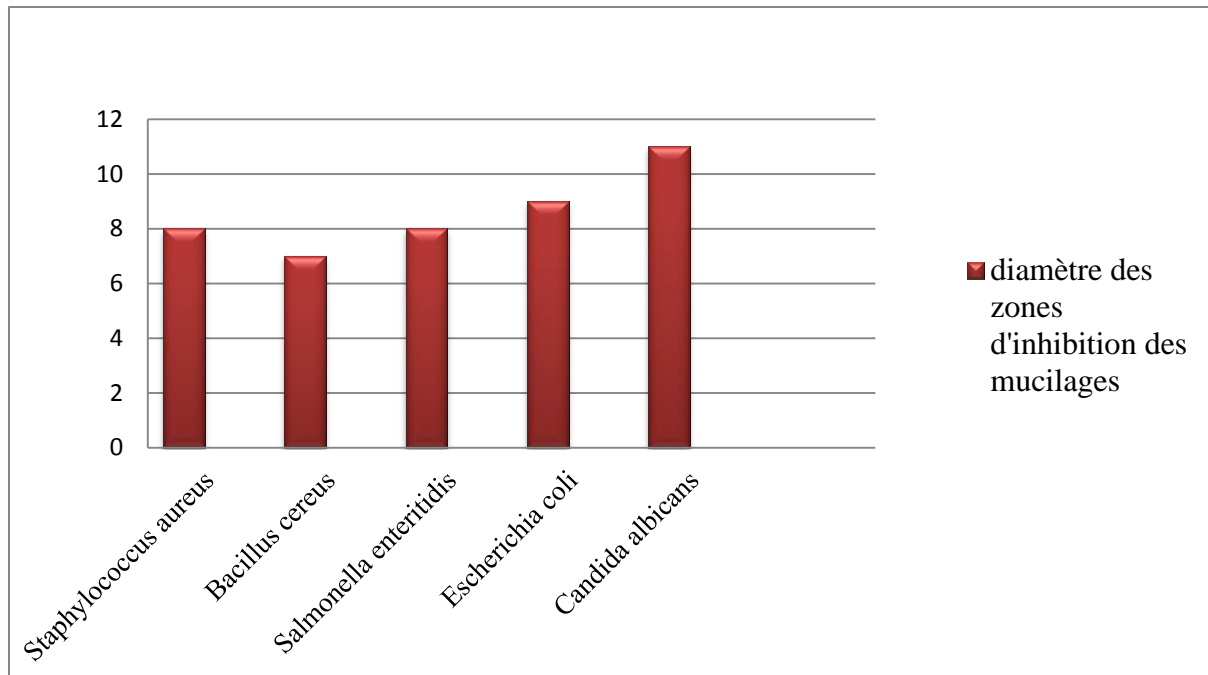


Figure n°16 : Histogramme représente les zones d'inhibition de l'extrait mucilage vis-à-vis les souches microbiennes pathogènes

Les résultats des tests antimicrobiens révèlent que les trois souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, sont résistantes à l'extrait mucilage de *Rubus ulmifolius* ces souches bactériennes sont extrêmement sensible à la Gentamicine et Streptomycine avec des zones d'inhibition remarquable.

Les zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enteritidis* sont de 8 mm, pour *Escherichia coli* on observe une zone d'inhibition de 9 mm.

Normalement, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux extraits que les bactéries à Gram négatif car elles contiennent des lipopolysaccharides hydrophobes dans la membrane externe qui peuvent les protéger contre différents agents, mais dans notre étude, l'extrait testé était efficace contre les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et les bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus*

Il a été observé que la levure *Candida albicans* présente la grande zone d'inhibition de 11 mm par rapport les autres souches bactériennes.

Discussion

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait des mucilages de la plante *Rubus ulmifolius* a été faite par la méthode de diffusion en puits. La méthode de diffusion sur disque n'a donné aucun résultat comme mentionné auparavant, cela probablement dues à la faible diffusion de l'extrait ou bien à la faible concentration.

Selon nos recherches bibliographique et nos connaissances, il n'existe pas des travaux antérieurs sur l'activité antimicrobienne d'extrait des mucilages de la plante *Rubus ulmifolius*. Pour cette raison, nos résultats ont été comparés à ceux obtenus pour d'autres plantes, et avec l'extrait méthanolique de la même plante.

D'après les résultats, on peut dire que la partie aérienne (tiges et feuilles) de *R. ulmifolius* présente un très bon rendement en extrait méthanolique de 19,05%, et en extrait des mucilages de 4,6 %. Ce qui est en cohérence avec les études de **Yu et al. (2014)** qui ont montré que la framboise (*Rubus idaeus* L.) présente une excellente source en polysaccharides par rapport à d'autres nutriments, et le rendement en polysaccharides était de 4,12%.

On peut déduire que le rendement, en extrait naturel d'une même espèce peut varier, et ceci en fonction de plusieurs paramètres. D'après **Koné et al. (2017)** on peut citer, la durée de séchage de la plante, une granulométrie du broyat inférieure à 0,4 mm, la nature et le pourcentage de solvant, la ratio volume sur masse, la technique et la durée d'extraction (macération, décoction...) et la vitesse d'agitation.

D'une part, les plantes des espèces de *Rubus* sont connues pour leurs propriétés antimicrobiennes (**Sisti et al., 2008**). D'autre part, l'évaluation de l'activité antimicrobienne de certains composés actifs isolés de *R. ulmifolius* donne des résultats prometteurs sur plusieurs microorganismes et notamment sur *Staphylococcus aureus* (**Panizzi et al., 2002**).

De même, les résultats de l'activité antimicrobienne d'un composé actif (Rubanthrone A) de la même plante contre *S. aureus* étudié par **Flamini et al. (2002)** sont assez proche à ceux de notre étude de sorte que la plante présente une activité antimicrobienne contre cette souche.

La sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries à Gram positif aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et aux extraits naturels due à leurs absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**).

En outre, Il apparaît que *Candida albicans* est la levure la plus sensibles au extrait des mucilages de *R. ulmifolius* par rapport les autres souches bactériennes, avec un diamètre de zone d'inhibition de 11 mm et concentration de 100 mg/ml, suivi par *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition légèrement moins importante.

De plus, cette forte activité a été confirmée par la comparaison avec l'antifongique Amphotéricine B (contrôle positif) qui présente une zone d'inhibition de 18 mm, sachant que la souche *Candida albicans* ATCC 10231 utilisé dans l'étude est multirésistante.

Concernant la souche *Escherichia coli* ATCC 25922, nos résultats sont un accord avec ceux de **Jasiem et al. (2016)** qui illustrent que l'extrait des mucilages de fruits de *Cordia myxa* présente une activité antimicrobienne très efficace contre les bactérie à Gram négatif (*E. coli*) isolée des urines des échantillons, avec des zones d'inhibition de 12, 12, 13, 13, 15 mm à différentes concentrations de 63,5, 125, 250, 500, 1000 (mg/ml) respectivement.

D'après **Hajaji et al. (2017)**, le criblage de l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'extrait méthanolique de *R. ulmifolius* a été étudié par l'utilisation de la technique de diffusion sur gélose. L'extrait testé a montré un bon effet contre tous les agents pathogènes, en particulier *E. coli*, et *C. albicans* avec des diamètres de zone d'inhibition de $28 \pm 2,8$, $39 \pm 1,4$ respectivement.

Les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ne présentent aucune zone d'inhibition autour des puits. Pour la souche *Bacillus cereus* ATCC 11778 les observations faites vont dans le sens inverse de ceux obtenus par **Khemakhem et al. (2018)** qui trouvent que le même extrait des feuilles d'olivier présente un effet inhibiteur avec un diamètre de 10 mm. Egalement, une autre étude de **Begum et Anbazhakan (2013)** explique que l'extrait des mucilages de *Dioscorea esculenta* a des propriétés antimicrobiennes contre trois souches bactériennes provoquer des infections humaines comme *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Il en ressort de cette analyse que chaque composé agit différemment sur les microorganismes. De ce fait, une étude plus approfondie sera nécessaire sur la purification du principe actif de cet extrait, afin d'ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments potentiels pour traiter des infections fongiques opportunistes résistantes.

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce présent travail, une étude des propriétés antimicrobiennes de la plante a été réalisée. C'est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle dans le Nord-est de l'Algérie, pour le traitement des affections cutanées, et les brûlures

Ce travail a été mené dans le cadre d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait des mucilages de la partie aérienne (tiges et feuilles) de *Rubus ulmifolius* vis-à-vis de sept germes responsable des infections humaines. La méthode de diffusion en puits a été suivie pour déterminer cette activité.

L'extrait du mucilage présente une bonne activité antifongique contre la souche *Candida albicans*, et une activité relativement moyenne vis-à-vis des trois souches bactériennes testées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enteritidis*). Tandis que, l'extrait ne possède aucun effet antimicrobien vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*.

En effet, notre travail reste préliminaire et l'extrait de la plante constitue un réservoir très intéressant pour des recherches ultérieures qui vont nous ouvrir des horizons de recherche ciblés vers cette plante en raison du manque des études concernant cette plante par rapport à leur richesse par plusieurs composés chimiques importants dans le domaine de la médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques.

En perspective il serait intéressant d'étendre l'éventail d'activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo* ainsi que la caractérisation des composés actifs dans cet extrait une vue de l'identification des différentes activités biologiques de cette plante.

Références bibliographiques

A

Abedini, A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Diplôme de doctorat, université de Lille. France.

Abot, A., Murphy, L., & Knauf, C. (2018). Axe intestin-cerveau et contrôle du métabolisme glucidique. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 53(1), 53-61.

Akhtar, K., Shah, S. W. A., Shah, A. A., Shoaib, M., Haleem, S. K., & Sultana, N. (2017). Pharmacological effect of *Rubus ulmifolius* Schott as antihyperglycemic and antihyperlipidemic on streptozotocin (STZ)-induced albino mice. *Applied Biological Chemistry*, 60(4), 411-418.

Akroum, S. (2011). Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Diplôme de doctorat, université Mentouri Constantine, Algérie.

Ali, N., Shoaib, M., Shah, S. W. A., Shah, I., & Shuaib, M. (2017). Pharmacological profile of the aerial parts of *Rubus ulmifolius* Schott. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 59.

Alonso-Sande, M., Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C., & Alonso, M. J. (2009). Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72 (2), 453-462.

Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., & Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food chemistry*, 98(1), 23-31.

Awika, J. M., & Rooney, L. W. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, 65 (9), 1199-1221.

B

- Balentine, C. W., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Duong, D. Q., & Pohlman, F. W. (2006).** The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73(3), 413-421.
- Bååth, J. A., Martínez-Abad, A., Berglund, J., Larsbrink, J., Vilaplana, F., & Olsson, L. (2018).** Mannanase hydrolysis of spruce galactoglucomannan focusing on the influence of acetylation on enzymatic mannan degradation. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 114.
- Becker, B., & Cooper, M. A. (2013).** Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS chemical biology*, 8(1), 105-115.
- Begum, A. T., & Anbazhakan, S. (2013).** Evaluation of antibacterial activity of the mucilage of *Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill. *Int. J. Mod. Biol. Med*, 4, 140-146.
- Benaissa, O. (2011).** Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.
- Benbelaïd, F., Khadir, A., Abdoune, M. A., & Bendahou, M. (2013).** Phytochemical screening and *in vitro* antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(6), 454-459.
- Bertrand, B. (2010).** Les secrets de l'Ortie.- 7ème édition. Editions de Terran (Collection Le Compagnon Végétal; N : 01), 128.
- Bezzaz, N. (2014).** Détermination structurale des métabolites secondaires, et extraction des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*. Mémoire de magistère : chimie organique. M'sila: Université de M'sila. Algérie.page :14.
- Bhattarai, M., Valoppi, F., Hirvonen, S. P., Hietala, S., Kilpeläinen, P., Aseyev, V., & Mikkonen, K. S. (2020).** Time-dependent self-association of spruce galactoglucomannans depends on pH and mechanical shearing. *Food Hydrocolloïde* , 102 , 105607.
- Bouakaz, I. (2006).** Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna. Algérie.

Références bibliographiques

Boudjouref, M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif.

Boughachiche, F. (2012). Etude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *streptomyces*, isolées de Sebkh. Thèse de doctorat. Université Mentouri – Constantine, Algérie ; 130p.

Boukef, M. K. (1986). Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique, Paris. Francia, pp: 208.

Boutaghane, N. (2013). Etude phytochimique et pharmacologique des plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Asteraceae). Thèse Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en sciences. Université de Constantine 1, pp : 11-58.

Bush, K. (2012). Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(5), 527-534.

C

Carette, J., Nachtergaeel, A., Duez, P., El Jaziri, M., & Rasamiravaka, T. (2020). Natural Compounds Inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation by Targeting Quorum Sensing Circuitry. In *Bacterial Biofilms*. IntechOpen.

Carlisle, P. L., Banerjee, M., Lazzell, A., Monteagudo, C., López-Ribot, J. L., & Kadosh, D. (2009). Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), 599-604.

Chavan, U. D., Shahidi, F., Naczki, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75 (4), 509-512.

Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., & Ed-Dra, A. (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 14(6), 355-362.

Références bibliographiques

Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites Occurrence, structure and Role in the Human Diet. Ed: Blackwell Publishing, pp: 372.

Chavan, U. D., Shahidi, F., Naczk, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75 (4), 509-512.

Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223-229.

Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissèdre, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.

Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites Occurrence, structure and Role in the Human Diet. Ed: *Blackwell Publishing*, pp: 372.

D

D'Agostino, M. F., Sanz, J., Sanz, M. L., Giuffrè, A. M., Sicari, V., Soria, A. C. (2015). Optimization of a Solid-Phase Microextraction method for the Gas Chromatography–Mass Spectrometry analysis of blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott) fruit volatiles. *Food Chemistry*, 178: 10-17.

Dakia, P. A., Wathelet, B., & Paquot, M. (2010). Influence de la teneur en galactose sur les interactions moléculaires et sur les propriétés physico-chimiques des galactomannanes en solution. *BASE*. 14(1), 213-223.

Daoudi, A., Bammou, M., Zarkani, S., Slimani, I., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2016). Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la commune rurale d'Aguelmouss province de Khénifra (Maroc). *Phytothérapie*, 14(4) : 220-228.

Delattre, C. (2005). Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse de doctorat, université de Picardie Jules Verne, Valois Santerre, 172p.

Références bibliographiques

Delavy, M., Cerutti, L., Croxatto, A., Prod'hom, G., Sanglard, D., Greub, G., & Coste, A. T. (2020). Machine Learning Approach for *Candida albicans* Fluconazole Resistance Detection Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Frontiers in microbiology*, 10, 3000.

Deore, S. L., & Khadabadi, S. S. (2008). Standardisation and pharmaceutical evaluation of *Chlorophytum borivilianum* mucilage. *Rasayan J Chem*, 1(4), 887-892.

Diallo, A. (2005). Etude de La phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense* WILLD (Myrtaceae). Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie (Diplôme d'état). Université De Bamako, 92 pp+annexes.

Dworkin, M. (2006). The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. *Springer Science & Business Media*.

F

Fabre, J. F. (2019). Etude *in vitro* et *in silico* de l'extraction, modification chimique et assemblage de phospholipides pour la construction de nouvelles vésicules végétales: exemple de la caméline (Doctoral dissertation). L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE. spécialité : Sciences des Agroressources.

Farid, B. A. (2011). Encyclopédie des plantes utiles, Flore méditerranéenne (Maghreb, Europe méridionale).

Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F., & Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food chemistry*, 140(4), 817-824.

Ferrez, Y., Royer, J. M. (2015). Identification de dix espèces communes de *Rubus* du nord-est de la France. *Les Nouvelles Archives de la Flore jurassienne et du nord-est de la France*, 13 : 121-142.

Ferrez, Y., & Bornand, C. (2019). Nouvelles observations de taxons de *Rubus* (sous-genre *Rubus*) dans le canton de Vaud. *Bulletin du Cercle vaudois de botanique*, 48 : 125-140.

Références bibliographiques

Flamini, G., Catalano, S., Caponi, C., Panizzi, L., & Morelli, I. (2002). Three anthrones from *Rubus ulmifolius*. *Phytochemistry*, 59(8), 873-876.

Fleurentin, J., & Hayon, J. C. (2016). Du bon usage des plantes qui soignent. Edition Ouest-France, 370 : 358.

Folta, K. M., & Gardiner, S. E. (2009). Genetics and genomics of Rosaceae. New York: Springer, 6: 411-506.

Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49-62.

G

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food chemistry*, 102(3), 898-904.

Gingichashvili, S., Duanis-Assaf, D., Shemesh, M., Featherstone, J. D., Feuerstein, O., & Steinberg, D. (2020). The Adaptive Morphology of *Bacillus subtilis* Biofilms: A Defense Mechanism against Bacterial Starvation. *Microorganisms*, 8(1), 62.

Goetting, V., Lee, K. A., & Tell, L. A. (2011). Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 34(6), 521-556.

Gow, N. A., Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 112-122.

Griffiths, M. W., & Schraft, H. (2017). *Bacillus cereus* food poisoning. In *Foodborne diseases* (pp. 395-405). Academic Press.

H

Haddouchi, F., Zerhouni, K., Adel, S. Y., & Chaouche, T. M. (2016). Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liege*, 85, 152-159.

Hajaji, S., Jabri, M. A., Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., B'chir, F., ... & Akkari, H. (2017). Amoebicidal, antimicrobial and *in vitro* ROS scavenging activities of Tunisian *Rubus ulmifolius* Schott, methanolic extract. *Experimental parasitology*, 183, 224-230.

Hans, W. K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. *Terre édition*, 6-7.

Hassan, A. (2019). Etude de l'impact des infections parasitaires et virales sur les maladies inflammatoires médiées par les lymphocytes *T* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67-202.

Hensel, W. (2008). *350 plantes Médicinales*. Delachaux et Niestlé SA, Paris : pp256.

Hummer, K. (2010). *Rubus* Pharmacology. Antiquity to the Present, 45(11) :1587-1591.

Hogan, D. A., Vik, Å., & Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, 54(5), 1212-1223.

Houekou, Y. P., Tchacondo, T., Gbogbo, A. K., Agban, A., Pissang, P., Atakpama, W., ... & Akpagana, K. (2016). Activités antimicrobiennes de *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock, une plante utilisée en médecine traditionnelle togolaise dans le traitement des infections microbiennes. *Afrique Science*, 12(5), 182-188.

Références bibliographiques

I

Ignat, C. M. (2012). Compatibilité et co-structuration dans des systèmes contenant des scléroprotéines et des polysaccharides. Thèse de doctorat. Université de PAU et des pays de l'adour.

Iserin, P. (2001). Larousse Encyclopédie des plantes médicinales : *identification, préparations, soins*. 2nd édition, Dorling Kindersiey Limited, Londres.

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J.P. (Eds). (2007). *Encyclopédie des plantes médicinales*. Larousse, pp14.

J

Jani, G. K., Shah, D. P., Prajapati, V. D., Jain, V. C. (2009). Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulation. *Asian Journal of Pharmaceutical*, 4(5), 308-322.

Jasiem, T. M., Al-mugdadi, S. F. H., Aljubory, I. S., & Latef, Q. N. (2016). Phytochemical study and antibacterial activity of crude alkaloids and mucilage of *Cordia myxa* in Iraq. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 39(1), 232-236.

Jdaidi, N., Hasnaoui, B. (2016). Etude Floristique et Ethnobotanique des Plantes Médicinales au Nord-ouest de la Tunisie: cas de la communauté d'ouled Sedra. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 3(1): 281-291.

Ji, P., Li, X., & Liu, Y. (2020). Dietary Intervention to Reduce *E. coli* Infectious Diarrhea in Young Pigs. *In E. coli Infection*. IntechOpen.

K

Khemakhem, I., Abdelhedi, O., Trigui, I., Ayadi, M. A., & Bouaziz, M. (2018). Structural, antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides extracted from olive leaves. *International journal of biological macromolecules*, 106, 425-432.

Références bibliographiques

Khosravi, A. D., Hoveizavi, H., Mohammadian, A., Farahani, A., & Jenabi, A. (2016). Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. *Acta chirurgica brasileira*, 31(3), 206-211.

Koné, K. P. F. O., Soro, Y., & Siaka, S. (2017). Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44, 15-22.

Korsak, N., Clinquart, A., Daube, G. (2004). *Salmonella spp*, dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Ann. Méd. Vét*, 148, 174-193.

ℒ

Ladoh-Yemeda, C. F., Vandi, T., Dibong, S. D., Mpondo, E. M., Wansi, J. D., Betti, J. L., ... & Eyango, M. T. (2016). Étude ethnobotanique des plantes médicinales commercialisées dans les marchés de la ville de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 99(1), 9450-9466.

Lazli, A., Beldi, M., Ghouri, L., & Nouri, N. E. H. (2019). Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous (Parc National d'El Kala, Nord-est algérien). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 88 : 22 – 43.

Lévi, Y. (2006). Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux. *Environnement, Risques & Santé*, 5(4), 261-265.

ℳ

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presse Polytechniques*.

Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Filomena Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food and Function*, 5(6): 1091-1100.

Références bibliographiques

Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., ... & Rossi, C. (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International journal of antimicrobial agents*, 34(1), 50-59.

Masson, S., Mesléard, F., & Dutoit, T. (2014). Impacts de différents régimes de perturbations et niveaux de ressource hydrique pour contrôler une espèce proliférante dans un écosystème pseudo-steppique: le cas de *Rubus ulmifolius* Schott. Dans la plaine de la Crau (Bouches-du-Rhône, France). *Acta Botanica Gallica*, 161(3), 261-275.

Mattila, P., & Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 152-160.

Mérens, A., Jault, P., Bargues, L., & Cavallo, J. D. (2013). Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *EMC - Maladies infectieuses*, 10(1), 1-18.

Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of Tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric*, 86(13), 2037.

N

Najjaa, H., Zouari, S., Arnault, I., Auger, J., Ammar, E., & Neffati, M. (2011). Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L. *Acta botanica gallica*, 158(1), 111-123.

Ngezahayo, J. (2016). Plantes médicinales du Burundi et maladies infectieuses: enquête ethnobotanique et activités antibactériennes directe et indirecte de composés isolés de *Platostoma rotundifolium* (Briq.) AJ Paton (Lamiaceae). Thèse de Doctorat en Sciences biomédicales et pharmaceutiques. Faculté de Pharmacie. Université libre de Bruxelles

Nkhili, E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Diplôme de doctorat, Montpellier, France.

O

Ouedraogo, A. S., Pierre, H. J., Banuls, A. L., Ouédraogo, R., & Godreuil, S. (2017). Émergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest: Facteurs

Références bibliographiques

Ounaissia, K., Smati, D., Laredj, H., Djafer, R., & Boualam, S. (2019). Plantes cicatrisantes utilisées en médecine traditionnelle dans l'Est Algérien. *ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 7(1), 663-678.

P

Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P., & Morelli, I. (2002). *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacol*, 79(2), 165–168.

Peronny, S. (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (*Lemur Catta*). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle.

Pesttrak, M. J., & Wozniak, D. J. (2020). Regulation of Cyclic di-GMP Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Microbial Cyclic Di-Nucleotide Signaling* (pp. 471-486). Springer, Cham.

R

Ret, D., Steiner, G., Gentilini, S., & Knaus, S. (2019). Exact determination of the degree of substitution of high molar mass hyaluronan by controlling the conformation in solution. *Carbohydrate Polymers*, 204, 124–130.

S

Sabtu, N., Enoch, D. A & Brown, N. M. (2015). Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. *British Medical Bulletin*, 116, 105-113.

Sahragard, N., & Jahanbin, K. (2017). Structural elucidation of the main water-soluble polysaccharide from *Rubus anatolicus* roots. *Carbohydrate polymers*, 175, 610-617.

Sáenz, C., Sepúlveda, E., & Matsuhira, B. (2004). *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of arid environments*, 57, 275-290.

Schulz, M., Seraglioia, S. K. T., Della Betta F., Nehring, P.,Valese, A. C., Daguer, H.,... & Fett, R. (2019). Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic

Références bibliographiques

compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food Research International*, 122, 627-634.

Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E., & Aceituno, C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia spp.* *Journal of arid environments*, 68, 534-545.

Sisti, M., De Santi, M., Fraternali, D., Ninfali, P., Scoccianti, V., & Brandi, G. (2008). Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 946-950.

Shirwaikar, A. A., Prabu, L. S., Mahalaxmi, R., and Rajendran, K. (2007). Studies of disintegrant properties of seed mucilage of *Ocimum gratissimum*. *Ind. J. Pharma. Sci.*, 21: 753-758

Souilah, N., & Madjroubi, K. (2018). Etude de la composition chimique et des propriétés thérapeutiques traditionnelles et modernes des huiles essentielles et des composés phénoliques de quelques espèces du Nord-est algérien. Thèse de doctorat : Chimie organique. Université des Frères Mentouri, Constantine 1, 95.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89(2), 191-198.

Soualmia, Y., & Benchahla, A. (2018). Optimisation de l'activité antibactérienne de quelques souches Fongiques. Mémoire de Master. Université Larbi Ben Mhidi Oum El Zouaghi. Algérie ; 29p.

T

Tabak, S. (2007). Interactions entre *Helicobacter pylori* responsable de maladies gastroduodénales et Bifidobacteries. Mémoire de magister, Université d'Oran.

Tabarki, S., Aouadhi, C., Mechergui, K., Hammi, K. M., Ksouri, R., Raies, A., & Toumi, L. (2017). Comparison of phytochemical composition and biological activities of *Rubus ulmifolius* extracts originating from four regions of Tunisia. *Chemistry & biodiversity*, 14(1), e1600168.

Références bibliographiques

Tang, Y., Davies, R., & Petrovska-Holmes, L. (2019). Differentiation between Two Live *Salmonella Enteritidis* Vaccines, and Wildtype Isolates of *S. Enteritidis* Using Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 447.

Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Tec & Doc. Lavoisier. Paris, France

V

Valoppi, F., Maina, N., Allén, M., Miglioli, R., Kilpeläinen, P. O., & Mikkonen, K. S. (2019). Spruce galactoglucomannan-stabilized emulsions as essential fatty acid delivery systems for functionalized drinkable yogurt and oat-based beverage. *European Food Research and Technology*, 245(7), 1387-1398.

Vandamme, E. J., S.DE BÆTS & A.STEINBÜCHEL. 2002. Imp.: WILEYVCH. Biopolymers –polysaccharides II, 322-323.

W

Wada, L., & Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3495–3500.

Y

Yao, K. R. (2019). Caractérisation phénotypique et moléculaire de *Salmonella spp* et *Escherichia coli* isolées chez les bovins dans le district d'Abidjan (côte d'Ivoire): impact biologique de l'utilisation des antibiotiques (Doctoral dissertation, Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire).

Youbai, A., & Ould, E. (2015). Contribution à l'étude des polysaccharides hydrosolubles de quelques plantes de la famille des Apiaceae récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Algérie). Mémoire, Université Kasdimerbah-Ouargla faculté des sciences de la nature et de la vie.

Références bibliographiques

Yu, Z. Y., Teng, X., Xu, Y. Q., & Li, X. G. (2014). Study on extraction process of raspberry polysaccharide with compound enzyme method. *Journal of Northeast Agricultural University*, 45(3), 52–58.

Z

Zampini, I. C., Cuello, S., Alberto, M. R., Ordonez, R. M., Almeida, R. D., Solorzano, E., and Isla, M. I. (2009). Antimicrobial activity of selected plant species from the Argentine puna against sensitive and multiresistant bacteria. *J. Ethnopharmacol.*, 124: 499-505.

Zhang, T. T., Lu, C. L., Jiang, J. G., Wang, M., Wang, D. M., & Zhu, W. (2015). Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of *Rubus chingii* Hu. *Carbohydrate Polymers*, 130, 307-315.

Zhang, D., Chia, C., Jiao, X., Jin, X., Kasagi, S., Wu, R.,....& Chen, W. (2017). D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology. *Nature Medicine*. 23(9), 1036.