

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des sciences agronomiques



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Agronomiques

Par

Abdelaziz MEROUANE

Thème :

Caractérisation phénolique et diversité génétique fondée sur des marqueurs moléculaires des populations de *Phlomis biloba* récoltées de la région de Chlef.

Soutenue le 10/01/2021, devant le jury composé de :

Rachida ALLEM	Professeur	Université de Chlef	Président
Abdelkader SAADI	Professeur	Université de Chlef	Rapporteur
Malika MEZIANE	MCA	Université de Chlef	Examinatrice
Moussa BRADA	Professeur	Université Khemis Miliana	Examineur
Ahmed ADDA	Professeur	Université de Tiaret	Examineur
Mohamed Ahmed Ali BEKADA	Professeur	Centre Universitaire Tissemsilt	Examineur

TABLE DES MATIERES

Remerciement	V
ملخص	VI
Résumé	VII
Abstract	VIII
Abréviations et acronymes	IX
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XIII
Introduction	1

Partie I: Revue bibliographique

Chapitre 1: Molécules bioactives et propriétés thérapeutiques du genre <i>Phlomis</i> L.	
1. Description botanique du genre <i>Phlomis</i> L.	8
2. Répartition géographique du genre <i>Phlomis</i> L.	9
3. Utilisation ethnobotanique des espèces de <i>Phlomis</i> L.	11
4. Phytochimie du genre <i>Phlomis</i> L.	13
4.1. Les huiles essentielles	13
4.2. Les composés phénoliques	16
4.2.1. Les acides phénoliques	16
4.2.2. Les flavonoïdes	18
4.3. Les iridoïdes	20
4.4. Les Phényle-éthyle-alcool glycosides	21
4.5. Autres métabolites secondaires	22
5. Les activités pharmacologiques des espèces <i>Phlomis</i> L.	23
5.1. Le potentiel antioxydant	23
5.2. Pouvoir antimicrobien et antiparasitaire	26
5.3. Activité antidiabétique	29
5.4. Activité anti-inflammatoire et antiallergique	30
5.5. Effet cytotoxique et antimutagène	31
5.6. Effet antiulcéreux	32
5.7. Activité anti-nociceptive	32
Chapitre 2: Diversité génétique et phylogénie du genre <i>Phlomis</i> L.	
1. La diversité génétique	35
2. Importance de l'étude de la diversité génétique	35
3. Les marqueurs génétiques	36
3.1. Les marqueurs morphologiques	36
3.2. Les marqueurs biochimiques	37
3.2.1. Les monoterpènes	37
3.2.2. Les allozymes	37
3.2.3. Les protéines totales	38
3.3. Les marqueurs moléculaires	38
3.3.1. Les marqueurs basés sur l'hybridation d'ADN	39

3.3.1.1. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism	39
3.3.2. Les marqueurs basés sur la technique PCR	39
3.3.2.1. RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA	40
3.3.2.2. SSR: Simples Sequence Repeats (Les microsatellites)	41
3.3.2.3. AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism	42
3.3.2.4. SNP: Single Nucleotide Polymorphism	43
3.3.2.5. ISSR: Inter Simple Sequence Repeat	43
3.3.2.6. Autres marqueurs (ITS, SCAR, STS...)	46
4. Exploitation de l'approche génomique pour l'étude des PMs	47
5. La diversité génétique du genre <i>Phlomis</i> L.	48
6. Phylogénie du genre <i>Phlomis</i> L.	49
6.1 Aperçu sur la phylogénie de la sous famille Lamioideae	50
6.2. Les révisions phylogénétiques du genre <i>Phlomis</i> L.	50

Partie II: Partie expérimentale

Chapitre 3: Étude phytochimique et biologique

1. Matériel végétal	55
1.1. Description botanique	55
1.2. Récolte	55
2. Les produits chimiques	56
3. Préparation des extraits	57
3.1. Les extraits bruts	57
3.2. Les extraits raffinés (taille des particules)	57
4. Test d'enrichissement d'un modèle d'aliment solide	58
4.1. Préparation de la solution osmotique	58
4.2. Préparation de l'aliment modèle	58
4.3. Processus de déshydratation osmotique	59
4.4. Préparation des extraits d'aliment modèle	59
5. Screening phytochimique	59
5.1. Dosage des composés phénoliques totaux	59
5.1. Dosage des flavonoïdes totaux	60
5.3. Dosage des flavonols	61
6. Détermination des propriétés antioxydantes	61
6.1. Test anti-radicalaire DPPH	62
6.2. Test de blanchissement β -carotène/acide linoléique	62
7. Analyses statistiques	64

Chapitre 4: Étude de la diversité génétique

1. Matériel végétal	66
2. Produits chimiques et réactifs	66
3. Extraction de l'ADN génomique	66
4. Dosage de l'ADN	67
4.1. Spectrophotométrie UV-Vis	67
4.2. Electrophorèse sur gel d'agarose	68
5. Amplification d'ADN	69
5.1. Les amorces ISSR	69

5.2. L'amplification PCR	70
6. Séparation de l'ADN amplifié (Electrophorèse sur gel d'agarose)	70
6.1. Préparation du gel	70
6.2. Migration et visualisation des amplifias	71
7. Analyse de données ISSR	71

Partie III: Résultats et discussion

Chapitre 5: Screening phytochimique et activité antioxydante	
1. Screening phytochimique	74
1.1. Rendement en extrait brut	74
1.2. Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT)	76
1.3. Teneurs en flavonoïdes totaux (FT)	78
1.4. Teneurs en flavonols	81
2. L'activité antioxydante	82
2.1. L'effet anti-radicalaire DPPH	83
2.2. Le pouvoir d'inhibition de blanchissement du β -carotène	85
3. Corrélation entre l'activité antioxydante et la composition phytochimique	87
Chapitre 6: Importance des particules dans les extraits	
1. Introduction	90
2. Effets des particules sur le contenu phytochimique et l'activité antioxydante des extraits	91
2.1. Définition	91
2.2. Impact sur le contenu phytochimique	92
2.3. Impact sur le pouvoir antioxydant	96
Chapitre 7: Valorisation de <i>P. biloba</i> en enrichissement alimentaire	
1. Composés phénoliques et enrichissement alimentaire	101
2. Teneur de l'aliment en composés bioactifs	102
4. Potentiel antioxydant de l'aliment model enrichi	108
4.1. Activité antiradicalaire DPPH•	108
4.2. Activité d'inhibition de blanchissement du β -carotène	110
Chapitre 8: Diversité génétique des populations de <i>P. biloba</i>	
1. Evaluation de la quantité et la qualité d'ADN extrait	114
2. Résultats d'amplification ISSR/PCR	115
2.1. Analyse des produits ISSR/PCR	115
2.1.1. L'amorce UBC807	115
2.1.2. L'amorce UBC810	116
2.1.3. L'amorce UBC811	117
2.1.4. L'amorce UBC818	119
2.1.5. L'amorce UBC823	121
2.1.6. L'amorce UBC824	122
2.1.7. L'amorce UBC834	123
2.1.8. L'amorce UBC836	123
2.1.9. L'amorce UBC846	125
2.1.10. L'amorce UBC855	126
3. Polymorphisme Intra-spécifique	127

4. Corrélation entre la diversité génétique et la variabilité phytochimique	129
Conclusions et perspectives	130
Références bibliographiques	134
Les annexes	

Remerciement

Alhamdou li-ALLAH (الحمد لله), qui nous a éclairé les voies de la science et de la connaissance et qui nous a aidé pour compléter cette recherche modeste.

Je veux tout d'abord remercier particulièrement mon directeur de thèse Mr. Saadi Abdelkader, professeur à l'université de Chlef, pour ses immenses contributions, critiques constructives, patience, compréhension, conseils, et appui au cours de la réalisation de cette thèse. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury:

- Mme ALLEM Rachida, professeur à l'université de Chlef, qui me fait l'honneur d'être le président de jury de ma thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.
- Mr. BRADA Moussa, professeur à l'université de Khemis-Miliana, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.
- Mr. ADDA Ahmed, professeur à l'université de Tiaret, d'avoir accepté de consacrer votre temps à cette thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.
- Mme MEZIANE Malika, Maitre de conférence et directeur du laboratoire de recherche Bioressources Naturelles "LBRN" à l'université de Chlef, d'avoir accepté de juger ce travail. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour vos qualités scientifiques et humaines.
- Mr. BEKADA Mohamed Ahmed Ali, Professeur au centre universitaire de Tissemsilt, pour avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et d'examiner mon travail.

Un remerciement particulier est adressé à Mr. le professeur Aichouni Ahmed ex-directeur du laboratoire de recherche Bioressources Naturelles "LBRN" à l'université de Chlef pour son bon accueil au laboratoire, ses encouragements et son énorme aide à la recherche.

Je suis particulièrement reconnaissant à mon collègue, ami et frère NOUI abdallah, vous étiez toujours à coté de moi. Je vous souhaite tous le succès et la réussite.

Je remercie également mes parents, ma fiancée, mes frères, mes sœurs et mes amis de leurs prières, encouragements et conseils qui m'ont soutenu pendant tous mon cursus académique.

Enfin, je voudrais passer mes vifs remerciements et excuses à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin, ils seront toujours dans ma mémoire.

ملخص

لمداواة الجروح و بعض الام البطن . من أجل تثمين فعال لخصائصها الطبية قمنا بدراسة التباين الوراثي باستخدام الوسم الجزيئي ISSR , الإختلاف الكيميائي الفينولي باستخدام التحديد الكمي و النشاط المضاد للأكسدة لأزهار و أوراق ست عينات من هذه النبتة الطبية من ستة وهي سيدي عامر، مجاجة، النخلة، تاوقريت، أبو الحسن و أولاد بن عبد القادر الواقعة بولاية الشلف. كما تمت دراسة أهمية حجم الجسيمات في المستخلصات النباتية و كذا إمكانية استغلال هذه النبتة في إغناء الأغذية بالمكونات الفينولية.

أظهرت النتائج إختلافا كبيرا بين العينات الستة من ناحية الكم الفينولي المتارجح بين $1,62 \pm 59,99$ (أزهار عينة النخلة) إلى $1,36 \pm 153,46$ ميكروغرام/مغ من المستخلص (أزهار عينة أبو الحسن) و الفلافونويدي (من $0,83 \pm 8,09$ إلى $0,24 \pm 53,84$ ميكروغرام/مغ من المستخلص) مع تفوق واضح للمستخلصات الميثانولية للأوراق مقارنة بالأزهار. تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقتين و هما الجذر الحر DPPH و تجربة تبيض البيتا كاروتين , و بينت النتائج قوة هذا النشاط و تعلقه الطردي مع الكم الفينولي، أعلى قيمة لهذا النشاط أظهرته عينة أوراق أبو الحسن و التس سجلت $\pm 47,78$ $1,11$ مغ/مل في النشاط المضاد للجذر الحر و نسبة $0,98 \pm 76,18$ % من تثبيط تبيض البيتا كاروتين.

أثبتت هذه الدراسة دورا فعالا للنانوجسيمات في الخصائص الفينولية و المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية، و التي ساهمت بحوالي $70,15$ % و $67,81$ % من فينولات المستخلص الميثانولي و المائي على التوالي. كما أن هذه الجسيمات ساهمت في النشاط المضاد للأكسدة بنسبة $72,47$ % (البيتا كاروتين) و $75,05$ % (الجذر الحر) للمستخلص الميثانولي. كما أن الإثراء الغذائي باستخدام نموذج غذائي أنتج غذاء غنيا بالمركبات الفينولية ($75,10 \pm 1023,33$ مغ/100غ) و الفلافونويدية ($50,0 \pm 602,50$ مغ/100غ) متجاوزا محتوى الخضر و الفواكه الأكثر غنى بالمركبات الفينولية و حسن بدرجة كبيرة النشاط المضاد للأكسدة للنموذج الغذائي.

من جهة أخرى بين التباين الوراثي إختلافا كبيرا بين العينات الستة لنبتة خياطة الجراح و أظهر التحليل العنقودي ثلاث مجموعات مرتبة تبعا للتوزيع الجغرافي.

الكلمات المفتاحية: *Phlomis* , التحليل العنقودي , الوسم الجزيئي ISSR , المركبات الفينولية , التنوع البيولوجي , مضادات الأكسدة الطبيعية.

Résumé

Phlomis biloba Desf. (Syn.: *P. crinita*) est une source de remèdes traditionnels dans la zone méditerranéenne. Pour une valorisation effective de ses vertus thérapeutiques, ce travail vise l'étude de la diversité génétique basée sur les marqueurs moléculaires ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), la caractérisation phénolique et le potentiel antioxydant des fleurs et des feuilles de six populations de *P. biloba* récoltées de Sidi Amer (SAM), Medjadja (MEJ), El-Nakhla (ENK), Taougrite (TAW), Abou El Hassen (AHS) et Ouled ben abdelkader (AOK) situant dans la wilaya de Chef. L'importance des particules dans les extraits et la possibilité d'une valorisation de cette bioressource dans l'enrichissement alimentaire sont testés en parallèle.

Le screening chimique a montré une variation considérable dans la teneur phénoliques de six populations allant de $59,99 \pm 1,62$ (fleurs de la population ENK) à $153,46 \pm 1,36$ μg EAG/mg d'extrait (feuilles de la population AHS) bien qu'en flavonoïdes (de $8,09 \pm 0,83$ à $53,84 \pm 0,24$ μg EQ/mg d'extrait) avec une supériorité remarquable des extraits de feuilles. Le pouvoir antioxydant testé par le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le système de blanchissement β -carotène a révélé un potentiel très important corrélé avec la teneur phénolique, le potentiel antioxydant le plus important a été enregistré par la partie feuilles de la population AHS avec $\text{IC}_{50} = 47,78 \pm 1,11$ mg/mL dans le test anti-DPPH et un taux de $76,18 \pm 0,98\%$ d'inhibition du blanchissement β -carotène.

La présente investigation a révélé une contribution notable des nanoparticules dans les caractéristiques phénoliques et antioxydantes des extraits. Ces particules ultrafines contribuent au contenu phénolique de 70,15% et 67,81% dans l'extrait méthanolique et aqueux respectivement, tandis 72,47% (test β carotène) et 75,05% (test DPPH) du pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique a été attribué aux nanoparticules. Le test d'enrichissement alimentaire par l'extrait de *P. biloba* a créé un aliment model très riche en composés phénoliques ($1023,33 \pm 75,10$ mg EAG/100g) et en flavonoïdes ($602,50 \pm 50,0$ mg EQ/100g) et dépassant le contenu bioactif des fruits et légumes reconnus par leur richesse phénolique avec une amélioration notable de leurs propriétés antioxydantes.

La caractérisation moléculaire a révélé un taux de polymorphisme très élevé entre les populations de *P. biloba* qui baigne entre 66,66% (AHS) à 84,61% (SAM, MEJ), l'analyse cluster a groupé les populations en fonction leur biogéographie.

Mot-clés: *Phlomis*, Analyse Cluster, ISSR, Composés phénoliques, Biodiversité, antioxydant naturel.

Abstract

Phlomis biloba Desf. (Syn.: *P. crinita*) is a traditional Mediterranean medicinal herb that is used as wound healing and as treatment of abdominal pains. For the effective valorisation of its medicinal values, level of genetic diversity based on inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers, phenolics characterisation and antioxidant potential of flowers and leaves of *P. biloba* were carried out, involving 6 populations collected from Sidi Amer (SAM), Medjadja (MEJ), El-Nakhla (ENK), Taougrite (TAW), Abou El Hassen (AHS) and Ouled ben abdelkader (AOK) situated in Chlef province. In parallel, the importance of particles size in their extracts as well as the possibility of its exploitation in food enrichment was investigated.

The chemical data showed considerable variation of phenolics content of population varying from 59.99 ± 1.62 (flowers of population ENK) à 153.46 ± 1.36 μg EAG/mg extract (leaves of population AHS) and flavonoids amounts (de 8.09 ± 0.83 to 53.84 ± 0.24 μg EQ/mg extract) among the six populations with remarkable superiority of leaves extracts. Antioxidant potential was tested by using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and β -carotene bleaching system. Results revealed strong correlation with phenolics contents. The most antioxidant activity was recorded by the leaves part of AHS with $\text{IC}_{50} = 47.78 \pm 1.11$ mg/mL as anti-DPPH potential and $76.18 \pm 0.98\%$ as inhibition rate of β -carotène bleaching.

The current study revealed a high contribution of nanoparticles in phenolics and antioxidant characteristics of extracts. These type of particles determines 70.15% and 67.81% of the phenolics contents of methanolic and aqueous extracts respectively, whereas 72.47% (test β carotène) and 75.05% (test DPPH) of the antioxidant potencies in methanolic extract were ascribed to nanoparticles presence. The food fortification using *P. biloba* extract created a rich foodstuff model in phenolics compounds (1023.33 ± 75.10 mg EAG/100g) and flavonoids (602.50 ± 50.0 mg EQ/100g), surpassing the known rich-in-phenolics fruits and vegetables and its antioxidant properties are greatly enhanced by the extract.

A high level of genetic diversity was detected among the populations varying between 66.66% (AHS) to 84.61% (SAM, MEJ), which were clustered into three groups based on their ISSR data and harmonized to their biogeographical location.

Keywords: *Phlomis*, Cluster analysis, ISSR, Phenolics compounds, Biodiversity, Natural antioxidant.

Abréviations et acronymes

<u>Abréviation</u>	<u>Nom complet</u>
2-D PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
AAR	Activité antioxydante relative
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AHS	La population récoltée d'Abou El Hassen
APG	Angiosperm Phylogeny Group
BET	bromure d'éthidium
BHT	Hydroxytoluène buthylé
CIN	Centre international de Nutrition
CPT	Les composés phénoliques totaux
DO	Densité optique
DOS	Déshydratation osmotique
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EAG	équivalent d'acide gallique
ENK	La population récoltée de El-Nakhla
EQ	Equivalent de quercétine
ERO	Espèces réactives d'oxygène
FAO	Food and Agriculture Organization
FOT	Les flavonols totaux
FT	Les flavonoïdes totaux
I%	Pourcentage d'inhibition
IC ₅₀	la concentration de l'extrait qui réduit 50% du radical libre DPPH
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MEJ	La population récoltée de Medjadja
MS	Matière sèche
OAK	La population récoltée d'Ouled Benabdelkader

PMs	plantes médicinales
pb	pairs de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLGA	Poly lactique-co-acide glycolique
PM ₀	Extrait sans macroparticules
PM ₁	Extrait sans microparticules
PM ₂	Extrait sans nanoparticules
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
SAM	La population récoltée de Sidi Amer
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STZ	le modèle diabétique Streptozocine
TAW	La population récoltée de Taougrite
UBC	University of British Columbia
USDA	US Department of Agriculture, Agricultural Research Service
Uv-Vis	Ultraviolet-visible
WHO	World Health Organization

Liste des figures

Titre	Page
Figure 1: Les acides phénoliques dominants et/ou communs dans les espèces <i>Phlomis</i> L.	17
Figure 2: Structure de trois grandes classes des flavonoïdes.	18
Figure 3: Les principaux flavonoïdes abondants chez le genre <i>Phlomis</i> L.	19
Figure 4: Les trois iridoïdes les plus répandus chez les espèces <i>Phlomis</i> L.	20
Figure 5: La réaction en chaîne polymérase (PCR) permis l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique dans un génome.	40
Figure 6: Concept d'analyse par une amorce ISSR.	44
Figure 7: analyse Cluster générée par les marqueurs RAPD de 11 espèces de la sous-section <i>Dendrophlomis</i> Bentham.	48
Figure 8: La partie aérienne de <i>Phlomis biloba</i> Desf.	55
Figure 9: Les lieux de récolte des populations.	56
Figure 10: Extraction d'ADN génomique de six populations.	67
Figure 11: Vérification de la qualité des d'ADN extraits par Electrophorèse sur gel d'agarose.	68
Figure 12: Thermocycleur (à gauche) et programme PCR (à droite) utilisé pour l'amplification ISSR-PCR.	70
Figure 13: Préparation du gel d'agarose par (a) dissolution au four micro-onde et (b) coulage dans un porte gel.	71
Figure 14: Rendements des populations de <i>P. biloba</i> en extrait brut.	75
Figure 15: Teneur phénolique des populations de <i>P. biloba</i> .	76
Figure 16: Teneur en flavonoïdes totaux des populations de <i>P. biloba</i> .	79
Figure 17: Teneur en flavonols des populations de <i>P. biloba</i> .	82
Figure 18: Pouvoir anti-DPPH des populations de <i>P. biloba</i> et des standards.	84
Figure 19: Taux d'inhibition de blanchissement du β -carotène des extraits de <i>Phlomis biloba</i> et des standards.	86
Figure 20: Teneur en composés bioactifs de l'extrait méthanolique (A) et aqueux (B) de <i>P. biloba</i> .	93
Figure 21: Importance des nanoparticules dans la teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique (A) et aqueux (B) de <i>P. biloba</i> .	94
Figure 22: Importance des nanoparticules des extraits dans l'inhibition de blanchissement β -carotène.	97
Figure 23: Teneur en composés phénoliques (mg EAG) et en flavonoïdes (mg EQ) contenue dans 100 g d'aliment modèle.	103

Figure 24: Cinétique de l'activité anti-radicalaire DPPH• de l'aliment modèle en fonction du temps d'imprégnation.	109
Figure 25: Taux d'inhibition de blanchissement du β -carotène de l'aliment dans différents intervalles d'imprégnation.	111
Figure 26: Profils électrophorétiques ISSR des populations de amorces UBC807 et UBC810.	117
Figure 27: Profils électrophorétiques ISSR des populations de amorces UBC811 et UBC818.	120
Figure 28: Profils électrophorétiques ISSR des populations de amorces UBC823 et UBC824.	122
Figure 29: Profils électrophorétiques ISSR des populations de amorces UBC834 et UBC836.	124
Figure 30: Profils électrophorétiques ISSR des populations de amorces UBC846 et UBC855.	126
Figure 31: Dendrogramme des six populations de <i>P. biloba</i> étudiées par des marqueurs ISSR basé sur l'indice de similarité Jaccard.	128

Liste des Tableaux

<u>Titre</u>	<u>Page</u>
Tableau 1. Distribution du genre <i>Phlomis</i> L. (espèces + sous espèces) dans les flores des pays et des zones.	11
Tableau 2. Principaux composés majoritaires des huiles essentielles du genre <i>Phlomis</i> L.	15
Tableau 3. Les phényle-éthyle-alcool glycosides communs dans les espèces de <i>Phlomis</i> .	22
Tableau 4. Propriétés antioxydantes des extraits issus de différentes espèces de <i>Phlomis</i> .	25
Tableau 5. Effets antimicrobiens des extraits de plusieurs espèces du genre <i>Phlomis</i> L.	28
Tableau 6. Comparaison de caractéristiques et convenance d'application des marqueurs moléculaires les plus utilisés chez les plantes.	46
Tableau 7. Place du genre <i>Phlomis</i> dans la systématique botanique.	52
Tableau 8. Préparation de la courbe d'étalonnage des composés phénoliques en acide gallique.	60
Tableau 9. Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes en quercétine.	61
Tableau 10. Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonols en rutine.	61
Tableau 11. Séquence et température d'hybridation des amorces ISSR utilisées.	69
Tableau 12. Coefficient de corrélation Pearson entre les différents essais sur les feuilles de <i>P. biloba</i> .	87
Tableau 13. Coefficient de corrélation Pearson entre les différents essais sur les fleurs de <i>P. biloba</i> .	88
Tableau 14. Différentes définition de nanoparticules et nanomatériels par les organisations de standardisation.	91
Tableau 15. activité antioxydante de différents extraits de <i>P. biloba</i> avec et sans particules.	96
Tableau 16. Coefficient de corrélation Pearson entre les différents essais sur les extraits de <i>P. biloba</i> .	99
Tableau 17. Teneur phénolique pour certains fruits et légumes (intervalles de plusieurs variétés) comparativement à l'aliment modèle enrichi en <i>P. biloba</i> .	105
Tableau 18. Teneur en flavonoïdes totaux pour certains fruits et légumes comparativement à l'aliment modèle enrichi en <i>P. biloba</i> .	107
Tableau 19. Qualité et quantité d'ADN extrait des populations de <i>P. biloba</i> .	114
Tableau 20. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC807.	115
Tableau 21. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC810.	116
Tableau 22. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC811.	118
Tableau 23. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC818.	119
Tableau 24. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC823.	121

Tableau 25. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC824.	122
Tableau 26. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC834.	123
Tableau 27. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC836.	124
Tableau 28. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC846.	125
Tableau 29. Analyse de produits des populations de <i>P. biloba</i> générés par l'amorce UBC855.	126
Tableau 30. Polymorphisme populationnel de l'espèce <i>P. biloba</i> .	127

Introduction

L'emploi des plantes par l'homme à des fins thérapeutiques est une pratique enracinée dans les traditions des anciennes civilisations, et les connaissances de préparation des remèdes sont transmises au cours de générations par des traditions orales ou transcrites qui sont devenus aujourd'hui un patrimoine commun pour l'humanité. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2003), 75 à 95 % des populations rurales (particulièrement dans les pays en voie de développement) font recours à la médecine traditionnelle qui repose, en grande partie, sur l'usage des plantes.

Selon certains auteurs, on estime à environ 20000 le nombre d'espèces utilisées dans le monde à des fins thérapeutiques (Naranjo, 1995). Aussi, il a été estimé qu'au moins 25 % des composés actifs des médicaments de synthèse prescrits ont été identifiés pour la première fois à partir de plantes (Balandrin et al., 1985).

Les plantes médicinales doivent leurs pouvoirs thérapeutiques à la présence de centaines, voire des milliers, de molécules chimiques naturelles bioactives, issues du métabolisme secondaire (Brandt et al., 2004). Les composés phénoliques forment un groupe chimique essentiel parmi les substances bioactives des plantes médicinales et constituent la classe des métabolites secondaires la plus étudiée par les scientifiques, durant la dernière décennie (Merouane et al., 2018). Plusieurs propriétés biochimiques et pharmacologiques sont attribuées à ce groupe, notamment des activités antioxydantes, anti-microbiennes, anti-inflammatoires, anti-allergique, anti-carcinogènes, etc., (Karabourniotis et al., 2014).

L'activité antioxydante des composés phénoliques semble être la propriété biologique la plus recherchée puisqu'elle permet de réduire l'oxydation des lipides dans les tissus (végétaux et animaux). Selon certains auteurs, l'incorporation des composés phénoliques dans l'alimentation humaine, contribue fortement à la conservation de la qualité de la nourriture et aussi à la réduction du risque de contracter certaines maladies. En effet, des études ont montré qu'une alimentation riche en fruits et légumes contribue au retard du processus de vieillissement et à la diminution du risque d'inflammation et de stress oxydatif, lié aux maladies chroniques (par exemple, les maladies cardiovasculaires, l'artériosclérose, le cancer, le diabète, la cataracte, les troubles de la fonction cognitive et des maladies neurologiques) (Someya et al., 2002; Eliassen et al., 2012; Sarawong et al., 2014). Les

composés phénoliques et polyphénols issus de fruits et légumes sont de meilleurs antioxydants que d'autres antioxydants courants tels que les vitamines C et E et contribuent à plus de 80 % à l'activité antioxydante totale (Cao et al., 1996; Wang et al., 1996).

Depuis plusieurs années, beaucoup d'efforts sont déployés, à travers le monde, pour rechercher et obtenir des molécules antioxydantes naturelles intéressantes, à partir de plantes. Et c'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail.

L'Algérie, de part la diversité de ses étages bioclimatiques et de l'immensité de son territoire, regorge de ressources phytogénétiques variées, particulièrement en plantes à intérêt médicinal et aromatique. On dénombre à plus de 300 espèces à usage thérapeutique et aromatique existant parmi les 3150 espèces végétales que compte le pays (Mokkadem, 1999).

Dans le but de valoriser nos ressources phytogénétiques, nous avons ciblé une plante médicinale, largement employée dans la pharmacopée traditionnelle locale pour soigner surtout les blessures et les maladies des voies respiratoires. Il s'agit notamment de l'espèce *Phlomis biloba* (ou *P. crinita*), connue sous le nom vernaculaire ("Khayat El-djerah"). C'est une plante spontanée, poussant à l'état sauvage dans plusieurs régions d'Algérie. Le genre *Phlomis*, appartenant à la famille des Lamiacées, comprend plus de 100 espèces de plantes vivaces distribuées en Afrique, en Asie et en Europe (Sarikurkcu et al., 2015). En Algérie, d'après Quezel et Santa, (1963), il existe 4 espèces: *Phlomis herba-venti* et trois espèces endémiques: *Phlomis bovei*, *P. caballeroi* et *P. biloba*.

Malgré leur importance dans la pharmacopée traditionnelle Algérienne et leur abondance dans le pays, les espèces *Phlomis* d'Algérie en général et *Phlomis biloba*, en particulier, n'ont pas fait l'objet de beaucoup de travaux de recherche scientifiques. Rares sont les études scientifiques qui ont traitées l'aspect phytochimique ou l'aspect aux activités biologiques des extraits de cette espèce (Kabouche et al., 2004; 2005).

Le choix de la plante *Phlomis biloba* Desf., pour conduire la présente étude, repose sur plusieurs raisons:

- D'abord, la plante revêt une importance capitale dans la pharmacopée Algérienne traditionnelle et même méditerranéenne. Elle est largement utilisée par les autochtones pour traiter divers maux: comme anti-cicatrisant d'où tire son nom arabe populaire « Khayat El-djerah » (cicatrisante des plaies), comme anti-douleurs abdominales et aussi comme stimulant de l'immunité (Limem et al., 2011). Elle est utilisée sous différentes formes médicamenteuses qui convient au patrimoine thérapeutique de la région. En Algérie et en Tunisie, la plante est généralement utilisée sous forme de poudre sèche alors qu'en Espagne les feuilles fraîches fragmentées sont habituellement utilisées sous forme de cataplasmes (Limem-Ben Amor et al., 2009).
- La plante fait partie des ressources phytogénétiques à intérêt médicinal (à grande valeur ajoutée) qui doit être à la fois valorisée et préservée. La valorisation de telles ressources peut contribuer au développement socio-économique du pays. En effet, les plantes *Phlomis*, grâce à leurs richesses en métabolites secondaires (phénylpropanoïdes, irridoides, diterpénoïdes, phényléthanoïdes, alcaloïdes, les acides phénoliques et les flavonoïdes) peuvent être exploiter pour l'extraction de molécules pourvues de principe actif (Kumar et al., 1992 ; Sarikurkcu et al., 2015; Kabouche et al., 2005; Sarikurkcu et al., 2014).
- Très rares sont les études qui ont été menées sur le screening et la variabilité phytochimique et biologique au sein des populations des espèces *Phlomis* Algériennes.
- La valorisation de *P. biloba* en domaine alimentaire par création des aliments enrichis en composés bioactifs. L'objectif de cette procédure est d'élargir le spectre d'utilisation de cette plante médicinale et de profiter au maximum de ses propriétés biologiques bénéfiques.

La présente étude, menée dans le cadre d'un projet de recherche PRFU sur la valorisation et la préservation des ressources phytogénétiques naturelles locales d'intérêt médicinal et aromatique, vise deux principaux objectifs.

- Le premier, consiste à caractériser les composés phénoliques présents dans différents extraits de feuilles et de fleurs, provenant de six populations de *P. biloba*, récoltées dans la région de Chlef et aussi à évaluer leurs potentialités antioxydantes. Seront évalués aussi d'autres aspects comme: l'impact des tailles des particules des extraits phénoliques de *P. biloba* sur l'activité antioxydante ou l'emploi des extraits phénoliques de *P. biloba* comme composés d'enrichissement alimentaire (test d'enrichissement alimentaire).
- Le second, ambitionne d'effectuer une caractérisation moléculaire (par l'emploi de microsatellites ISSR) des différentes populations étudiées en vue de mettre en évidence la variabilité génétique existante (entre populations) et ses répercussions sur la composition phytochimique.

Partie I: Revue bibliographique

Partie I: Revue bibliographique

Chapitre 1.

Molécules bioactives & Propriétés thérapeutiques du genre *Phlomis* L.

Chapitre 1. Molécules bioactives et propriétés thérapeutiques du genre Phlomis L.

La famille des Lamiaceae ou Labiatae, est une vaste famille botanique comportant des plantes majoritairement aromatiques, distribuées dans les différentes zones du globe terrestre avec une concentration particulière dans la région méditerranéenne. Elle comprend environ 7000 espèces d'herbes, d'arbustes ou d'arbres mais aussi des plantes grimpantes classées dans plus de 260 genres (Gurchan, 2010). Les genres les plus larges en terme d'espèces sont: le genre *Salvia*, (renfermant plus de 900 espèces) (Kivrak et al., 2009), *Clerodendrum* (400 espèces), *Thymus* (340), *Plectranthus* (300), *Scutellaria* (300), *Stachys* (300), *Nepeta* (260), *Teucrium* (200), *Callicarpa* (150), *Ocimum* (150), *Phlomis* (100) (Jabeen et al., 2013), *Lamium* (50), *Marrubium* (40), *Mentha* (30), *Lavandula* (30) et *Tectona* (3) (Gurchan, 2010).

De point de vue phylogénétique, la famille des Lamiaceae est l'une des familles dicotylédones les plus évoluées, systématiquement elle est très liée à la famille des Verbenaceae ce qui justifié les révisions de l'Angiosperm Phylogeny Group II (APG II) transférant la majorité des genres de cette dernière vers la famille des Lamiaceae (APG, 2003) afin de créer un groupe monophylétique pour les deux familles (Mathiesen et al., 2011). En cladistique, la famille des Lamiaceae comporte les cinq (5) sous-familles suivantes: *Nepetoideae*, *Lamioideae*, *Pogostemonoideae*, *Scutellarioideae* et *Teucroideae* (*Ajugoideae*) (Wagstaff et al., 1998), auxquelles on adjoint les deux sous-familles *Symphorematoideae* et *Prostantheroideae* citées dans les travaux de Thorne (2007).

1. Description botanique du genre *Phlomis* L.

Les espèces du genre *Phlomis* L. sont des plantes herbacées, des sous-arbrisseaux ou des arbustes, rustiques ou semi-rustiques. Les feuilles sont veinées, entières, opposées et rugueuses ou réticulées. Les feuilles ou les bractées florales sont semblables ou différentes aux feuilles inférieures. Toutes les parties des plantes sont fréquemment couvertes de poils, qui sont principalement radiés ou dendroïdes et qui peuvent prendre de nombreuses formes y compris glandulaires.

Les fleurs des espèces de *Phlomis* L. sont disposées en verticilles autour des tiges qui sont habituellement de section carrée avec les coins arrondis, bien que l'indument sur les tiges leur donne un aspect plus circulaire. La couleur des fleurs change du jaune au rose, pourpre ou blanc. Les bractéoles, si elles sont présentes, entourent entièrement les verticilles, et sont ovales, lancéolées ou linéaires. Le calice est tubulaire ou campanulé avec 5 ou 10 veines visibles. Les 5 dents des calices sont de la longueur égale ou les deux externes sont plus longues que les autres. Les dents peuvent avoir diverses formes. Les étamines sont au nombre de 4 sortant sous la lèvre supérieure. L'anthère a une extrémité bifide, la fourchette supérieure étant plus courte que celle du dessous. Les fruits ont 3-4 faces, parfois surmontées avec de petits poils, ou parfois glabres. Le système racinaire peut être très étendu, de temps en temps avec des tubercules (Li et Hedge, 1994).

2. Répartition géographique du genre *Phlomis* L.

Le genre *Phlomis* L. est le genre le plus large de la sous-famille Lamioidae, il inclut plus de cent (100) herbes ou arbustes (Sarikurkcu et al., 2015) repartis en deux (2) grandes sections *Phlomis* et *Phlomoides* (Moench, 1794) avec une aire de répartition allant de la zone méditerranéenne à l'Asie centrale et la Chine (Sarikurkcu et al., 2015). Il était remarqué que les espèces de la section *Phlomis* sont plus abondantes dans la région méditerranéenne alors que la section *Phlomoides* domine la flore de l'Asie centrale et de la Chine (Hedge, 1986). En outre, la division *Phlomoides* n'inclut que des herbes tandis que le groupe *Phlomis* regroupe des plantes arbustes ou sous-arbustes (Mathiesen et al., 2011). La distinction entre les deux sections est basée sur des caractères morphologiques établis et mentionnés pour la première fois par Moench (1794), mais la variation est indiquée aussi dans le matériel génétique des deux groupes y compris le nombre chromosomique dont *Phlomis* présente généralement $2n=20$ alors que *Phlomoides* possède $2n=22$ (Azizian et Cutler, 1982).

En termes de chiffre, la flore Chinoise est classée au premier rang suivie de celle de l'Ex-URSS (Kabouche et al., 2005). Dans l'aire méditerranéenne, la flore Turque est la plus diversifiée avec environ trente quatre (34) espèces (49 en comptant les sous espèces) et un taux d'endémisme de 57% (Tableau 1). À cause de la grande diversification, la Turquie, notamment les régions Est et Sud d'Anatolie, est proposée comme étant le lieu d'origine de la section *Phlomis* (Hedge, 1986).

Concernant la flore d'Algérie, d'après Li et al. (2010), elle compte six espèces appartenant au genre *Phlomis* (Tableau 1), dont les trois espèces *P. caballeroi*, *P. bovei* et *P. crinita* (*P. biloba*) sont énoncées endémiques (Quezel et Santa, 1963). Cependant, les deux dernières espèces ne sont plus endémiques d'après les data récentes indiquant *P. bovei* comme espèce endémique à l'ensemble de la flore maghrébine (Algérie, Tunisie et Maroc), et que *P. crinita* figure aussi dans la flore Tunisienne et Ibérienne (Mathiesen et al., 2011).

Tableau 1. Distribution du genre *Phlomis* L. (espèces + sous espèces) dans les flores des pays et des zones d'après Li et al, (2010).

Pays ou région	Nombre	Pays ou région	Nombre
Chine	72	Crimée	4
Ex-USSR	52	Pakistan	4
Turquie	49	Ex-Yougoslavie	4
Iran	31	Îles Égéennes (Turquie)	3
Liban & Syrie	26	Kashmir (Pakistan)	3
Iraq	15	Portugal	3
Espagne	11	Sinaï (Égypte)	3
Maroc	8	Albanie	2
Crète & Karpathos (Grèce)	8	Bulgarie	2
Afghanistan	8	Burmie	2
Cyprès	7	Égypte	2
Népal	7	France	2
Algérie	6	Sicile (Italie)	2
Grèce	6	Corée du Nord	1
Palestine & Jordanie	6	Îles Baléares (Espagne)	1
Tunisie	5	Libye	1
Inde (Himalaya)	5	Sardinia (Italie)	1
Italie	4	Zone méditerranéenne	160

3. Utilisation ethnobotanique des espèces de *Phlomis* L.

D'après la littérature, la majorité des espèces du genre *Phlomis* L. sont considérées, dans plusieurs pharmacopées et/ou civilisations, comme des plantes médicinales offrant une multitude de vertus thérapeutiques traditionnelles. Le spectre d'utilisation ethnobotanique de ces espèces dépend de leurs caractéristiques médicinales, mais aussi de leur accessibilité dont celles qui poussent dans des altitudes élevées et des régions montagneuses sont rarement citées dans les patrimoines thérapeutiques (Limem-Ben Amor et al., 2009a).

Les membres de *Phlomis* L. ont été employées comme des plantes à propriétés médicinales salutaires depuis l'antiquité, dont elles sont mentionnées dans les travaux du médecin Romain Dioscorides (Couladis et al., 2000) et ne cessent pas d'être utilisées à nos jours notamment dans la région méditerranéenne (Georgescu et al., 2016). Les différentes parties de ces plantes médicinales sont exploitées dans les préparations médicamenteuses, y compris les feuilles (*P. aspera*, *P. cephalotes*...), les fleurs (*P. aspera*, *P. rotata* ...), les graines (*P. cephalotes*...), et les racines (*P. nepetaefolia*...) (Limem-Ben Amor et al., 2009a), pour traiter essentiellement l'ulcère, les inflammations, les hémorroïdes et les blessures (Couladis et al., 2000; Kirmizibekmez et al., 2005; Limem-Ben Amor et al., 2009a), elles sont décrites également dans la protection contre les différentes maladies hépatiques, rénales et cardiovasculaires (Jabeen et al., 2013), bien que dans le traitement des douleurs gastro-intestinales (Sarkhail et al., 2010).

Les espèces de *Phlomis* L. étaient un composant fréquent des mélanges de tisanes populaires. En Syrie, une tisane nommée "Zahraa" préparée de 6 à 14 plantes y compris *P. syriaca* est largement consommée aux maisons, restaurants et cafeterias du Damas (Carmona et al., 2005). L'espèce *P. crinita* est traditionnellement utilisée dans les traditions Algériennes, Espagnoles et Tunisiennes pour soigner les lésions et les brûlures d'où le nom vernaculaire "Khayat el-djerah" en Algérie (Limem-Ben Amor et al., 2009a), quoi que ce nom est attribué aussi à *P. bovei* partageant les mêmes indications thérapeutiques (Liolios et al., 2007).

L'espèce *P. lychnitis* est communément utilisée comme tisane au presqu'île Ibérienne, sous les noms "Matagallo real" (Espagne) (Fernández-Ocaña et al., 1996) et "Salvinha" (Portugal) (Novais et al., 2004), vu leurs propriétés analgésique, anti-hémorroïdale, astringente, carminative, sédative, tonique, anti-inflammatoire, antispasmodique, et anti-diarrhéique. D'autre part, la richesse de la flore Anatolienne en espèces de *Phlomis* a garantie une abondance et une variation unique au patrimoine thérapeutique traditionnel Turque dominé essentiellement par la préparation des tisanes à partir des parties aériennes de plusieurs espèces dont *P. angustissima*, *P. bourgei*, *P. fruticosa*, *P. grandiflora*, *P. linearis*, *P. lycia*, et *P. russeliana* à des fins pharmaceutiques diverses (Limem-Ben Amor et al., 2009a).

Au presque-continent indien, les espèces de *Phlomis* L. sont employées à divers fins thérapeutiques. *P. linifolia* et *P. zeylanica* sont décrites contre les morsures des reptiles (Bangladesh), *P. aspera* est largement exploitée en Inde et au Bangladesh pour traiter la toux et la grippe (Khanam et AbulHassan, 2005), alors que *P. plukenetii*, *P. cephalotes*, et *P. linifolia* sont utilisées au Népal contre la fièvre et la grippe (Manandhar, 2002). Les traditions phyto-thérapeutiques chinoises ont décrit aussi les importances pharmaceutiques des membres du genre *Phlomis* L. à l'instar de *P. umbrosa* employée pour ces propriétés détoxifiantes, anti-inflammatoire, et antihémorragiques (Liu et al., 2007). Au Tibet, *P. younghushandii* est décrite traditionnellement dans le traitement de la fièvre et la grippe (Law et Salick, 2007).

4. Phytochimie du genre *Phlomis* L.

Les métabolites secondaires des plantes sont répartis, selon leur origine biosynthétique, en trois grands groupes chimiques : les composés phénoliques (y compris les composés alliés), les terpénoïdes et les alcaloïdes (Crozier et al., 2006).

Le screening phytochimique des espèces du genre *Phlomis* réalisés à travers une multitude d'investigations a révélé la présence d'une gamme très variée de métabolites secondaires comptant les huiles essentielles, Les composés phénoliques incluant essentiellement des acides phénoliques, des flavonoïdes et des lignanes, les iridoïdes, les saponines, les phényle-éthyle-alcoolset benzyles glycosides ainsi que d'autres composés chimiques caractérisant ce groupe végétal (Limem-Ben Amor et al., 2009a).

4.1. Les huiles essentielles

Les différentes parties des espèces appartenant au genre *Phlomis* L. accumulent des huiles essentielles et exhalent des odeurs caractéristiques (Li et al., 2010), dont certains membres d'entre elles sont cultivées comme plantes ornementales vu leur suave fragrance (NCCPG, 2018). L'analyse chromatographique des huiles distillées de diverses espèces *Phlomis* ont révélé des profils chimiques très variables avec un nombre limité de composés majoritaires qui ne dépasse pas une dizaine de constituants (Tableau 2).

La diversité qualitative et quantitative des constituants des huiles essentielles des espèces *Phlomis* est notée au niveau intraspécifique et interspécifique, mais également entre les différentes parties de la même espèce, dont les feuilles et les fleurs de *P. fruticosa* (Tsitsimi et al., 2000; Sokovic et al., 2002), de *P. crinita* (Limem-Ben Amor et al., 2008), et de *P. herba-venti* (Morteza-Semnani et al., 2004) ont montré des mixtures chimiques différentes. D'autre part, la composition est soumise aux facteurs externes tel que l'origine, dont les huiles extraites des parties aériennes de *P. olivieri* récoltée de deux régions différentes d'Iran ont dévoilé des compositions variables (Ghassemi et al., 2001; Mizra et Nik, 2003).

D'après les investigations de la composition des huiles essentielles au sein du genre *Phlomis* L., ses espèces peuvent être catégorisées en quatre chémotypes distincts (Limem-Ben Amor et al., 2009a) à savoir:

- Chémotype I: les membres de ce groupe, incluant *P. lanceolata*, *P. anisodonta*, *P. cretica*, *P. crinita*..., sont caractérisés par une richesse en sesquiterpènes avec dominance de deux composés germacrène D et le β -caryophyllène (Sarkhail et al., 2005; Basta et al., 2006; Limem-Ben Amor et al., 2008).
- Chémotype II: Les monoterpènes et les sesquiterpènes dominent les huiles essentielles des espèces (*P. fruticosa*, *P. leucophracta*, *P. chimerae*, *P. grandiflora*, *P. bovei*) de ce groupe, dont α -pinène, limonène et linalool bien que les sesquiterpènes du chémotype précédent (germacrène D et β -caryophyllène) sont les constituants majoritaires de ses huiles (Ristic et al., 2000; Celik et al., 2005; Liolios et al., 2007).
- Chémotype III: Groupe, connu pour son abondance en acides gras, en composés aliphatiques et en alcools. Les composés majoritaires de ces huiles (*P. umbrosa*, *P. megalantha*...) sont l'acide hexadécanoïque, trans-phytol et 9,12,15-octadécatrien-1-ol (Zhang et Wong, 2008).
- Chémotype IV: Les huiles de ce chémotype renferment des acides gras avec dominance de l'acide hexadécanoïque et α -pinène comme

monoterpènes majoritaires bien que les sesquiterpènes représentés majoritairement par germacrène D (Zhang et Wong, 2008).

Tableau 2. Principaux composés majoritaires des huiles essentielles du genre *Phlomis* L.

Espèces	<i>Phlomis szechuanensis</i>	<i>Phlomis brugueri</i>	<i>Phlomis cretica</i>	<i>Phlomis herba-venti</i>	<i>Phlomis crinita</i>	<i>Phlomis crinita</i>	<i>Phlomis fruticosa</i>	<i>Phlomis lanata</i>
Partie distillée	PA	PA	PA	feuilles	feuilles	fleurs	fleurs	PA
Origine	Chine	Turquie	Grèce	Iran	Tunisie	Tunisie	Grèce	Grèce
Méthode d'extraction	HD	HD	HD	HD	HD	HD	HD	EV
Les composés dominants	Teneur (%)							
Germacrène D	-	60,5	34	33,9	39,1	35,1	17,8	-
β -caryophyllène	-	-	-	-	-	58,2	8,7	-
γ -élémentène	-	16,5	-	-	-	-	-	-
Germacrène B	-	7,1	11	-	-	-	-	-
trans-Caryophyllène	-	-	-	-	40,9	-	-	-
trans-Phytol	50,8	-	-	-	-	-	-	-
Acide hexadécanoïque	7,1	-	-	12,9	-	-	-	-
α -pinène	-	-	-	9,4	-	-	8,9	25,4
Limonène	-	-	-	-	-	-	-	15,7
(Z)- γ -bisabolène	-	-	-	-	-	-	12,6	-
Référence	Zhang et Wong (2008)	Sarkhail et al. (2005)	Basta et al. (2006)	Morteza-Semmani et al. (2004)	Limem-Ben Amor et al. (2008)	Limem-Ben Amor et al. (2008)	Tsitsimi et al. (2000)	Couladis et al. (2000)

PA: les parties aériennes; HD: hydrodistillation; EV: Entraînement à la vapeur.

Plusieurs facteurs peuvent affecter la composition chimique des huiles essentielles générant ainsi de nouveaux chémotypes. En effet, la méthode d'extraction, l'âge de la plante, les conditions climatiques, le temps de récolte et la pollinisation intra et interspécifique ont tous un impact majeur sur cette composition. Le classement des espèces dans des chémotypes bien définis n'est pas définitif vu la variabilité intra-spécifique considérable et la dépendance de la composition à la zone géographique, dans ce contexte Zhang et Wong

(2008) ont démontré que les huiles de deux espèces *Phlomis* récoltées de la même région manifestent des taux de similarité très élevés.

4.2. Les composés phénoliques

Le terme “polyphénols” est habituellement utilisé dans le langage courant et même dans des documents scientifiques pour désigner l'ensemble des composés phénoliques. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols, ce qui exclurait alors les monophénols, portant abondants et importants pour les végétaux. Pour éviter toute équivoque, il est préféré d'utiliser le terme “composés phénoliques” qui désigne à la fois les mono-, di- et polyphénols dont les molécules contiennent une, deux, ou plusieurs fonctions phénoliques (Macheix et al., 2005).

La recherche de composés phénoliques dans les plantes médicinales et/ou aromatiques a pris une allure croissante au cours de la dernière décennie, ce qui est traduit par le nombre d'études consacrées à ce sujet dans différentes bases de données scientifiques. À titre d'exemple, le nombre de recherches incluant ce terme dans leurs titres est estimé à 314.065 data dans la base Elsevier (Elsevier, 2018a) et plus de 22.225 articles dans la data-base Pub-Med (Pub-Med, 2019).

Le groupe des composés phénoliques regroupe tout composé chimique caractérisé par au moins un cycle aromatique (à 6 atomes de carbone), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester ou hétéroside. Ce groupe est largement distribué dans le règne *Plantae* avec plus de 8.000 structures phénoliques décrites et il s'étend d'une simple structure à petit poids moléculaire (acides phénoliques) à des structures très polymérisées de tannins et de dérivés polyphénoliques (Crozier et al., 2006).

4.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques représentent la classe la plus simple (moins d'isomérisation) des composés phénoliques. Ils sont exploités, en plus des flavonoides, comme marqueurs chémotaxonomiques dans l'analyse de la diversité intraspécifique et inter-variétale (Kim et al., 2013; Liu et al., 2013). Les investigations chromatographiques disponibles révèlent que

l'acide chlorogénique et l'acide caféique (Figure 1) sont communs et/ou majoritaires pour toutes les espèces *Phlomis* étudiées à nos jours (Sarikurkcü et al., 2015 ; Sarikurkcü et al., 2014 ; Zhang et Wong, 2009 ; Harput et al., 2006).

Les profils chromatographiques de trois extraits (aqueux, méthanolique et éthyl-acétate) préparés de la partie aérienne de *P. nissolii*, *P. pungens* et *P. armeniaca* révèlent la présence de sept acides phénoliques semblables avec dominance de l'acide chlorogénique et l'acide benzoïque (Figure 1) (Sarikurkcü et al., 2015 ; Sarikurkcü et al., 2014). Dans une autre étude menée sur deux espèces de *Phlomis* (*P. umbrosa* et *P. megalantha*) de la flore chinoise, Zhang et Wong (2009) montrent la présence d'une mixture de onze acides phénoliques, relativement semblable, dominée essentiellement par l'acide chlorogénique, l'acide ferulique et l'acide rosmarinique (Figure 1). Le screening chromatographique de *P. syriaca* (Harput et al., 2006), de *P. olivieri* (Delnavazi et al., 2016) et de *P. longifolia* (Ersöz et al., 2001a) confirme aussi la dominance de l'acide chlorogénique dans la mixture phénolique des membres du genre *Phlomis* L.

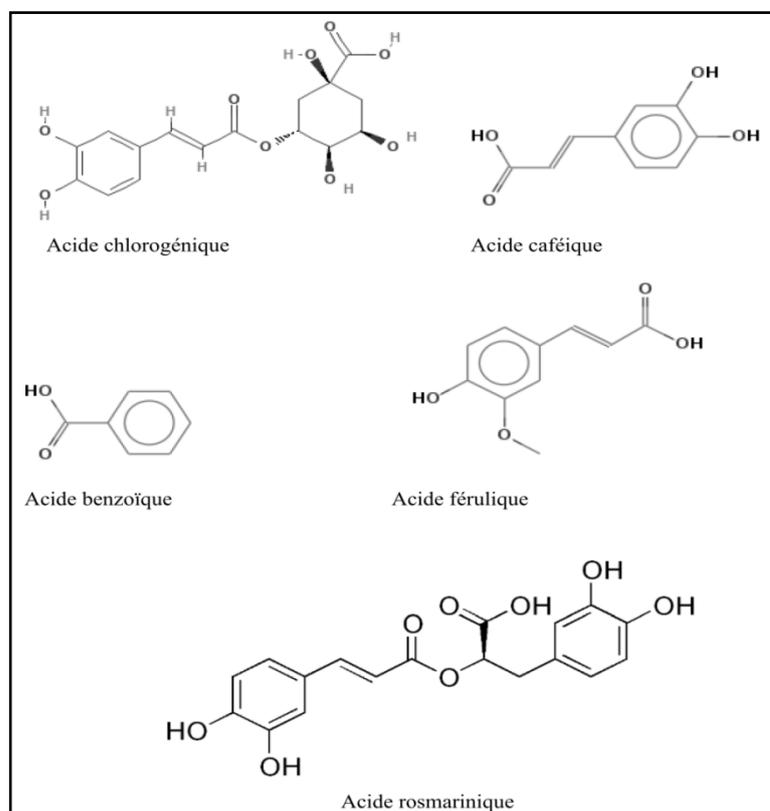


Figure 1: Les acides phénoliques dominants et/ou communs dans les espèces *Phlomis* L. d'après Sarikurkcü et al. (2015) et Sarikurkcü et al. (2014).

4.2.2. Les flavonoïdes

Le terme "flavonoïde" est fréquemment utilisé pour désigner un large groupe de métabolites secondaires caractérisées par une structure C₆-C₃-C₆, ou plus spécifiquement d'un groupement phénylbenzopyrane (Vermerris et Nicholson, 2008; Marais et al., 2006). Selon la position de la partie liée au cycle aromatique benzopyrano (chromano), ce groupe phénolique peut être divisé en trois classes: les flavonoïdes (2-phénylbenzopyranes), les isoflavonoïdes (3-benzopyranes), et les néoflavonoïdes (4-benzopyranes) (Figure 2). Les autres composés naturels caractérisés également par la structure C₆-C₃-C₆ et qui ne sont pas inclus dans les trois classes des flavonoïdes, tels que les chalcones et les aurones, sont qualifiés de flavonoïdes mineurs (Marais et al., 2006).

Les flavonoïdes se présentent aussi sous forme de dérivés méthylés, conjugués avec des monosaccharides et des disaccharides, et ils forment aussi des complexes avec les oligosaccharides, les lipides, les composés azotés, les acides carboxyliques et organiques donnant un nombre total d'environ 8 000 structures (Duthie et al., 2003).

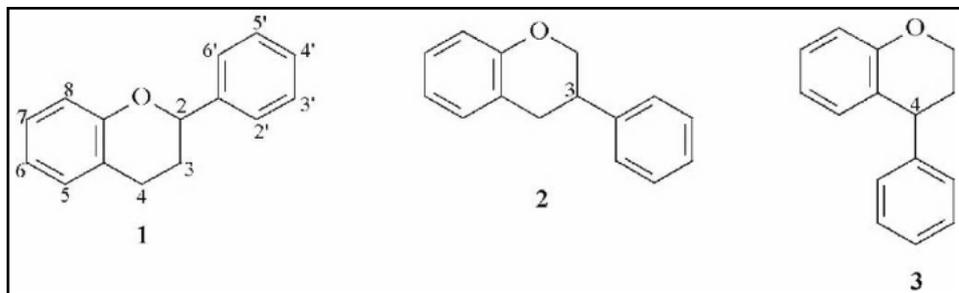


Figure 2: Structure de trois grandes classes des flavonoïdes. (1) structure des les flavonoïdes; (2) structure des isoflavonoïdes et (3) structure des néoflavonoïdes (Marais et al., 2006).

Les flavonoïdes sont les constituants les plus isolés des espèces *Phlomis*. D'après Li et al. (2010), 46 flavonoïdes ont été isolés à partir des espèces *Phlomis*, avec une abondance notable de l'apigénine, lutéoline, kaempférol, quercétine, isoorientine, naringénine et p-coumaroyl glucosides (Figure 3). Limem-Ben Amor et al. (2009a), confirment et signalent la présence d'autres molécules flavonoïdes tels que les glycosides 7-O-glucosides, les 7-O-glucuronides et les 7-rutinosides d'apigénine, la lutéoline, le chrysoériole, le flavone C-

glycoside vicénine-2 et les flavanones: naringénine, et ériodictyole dans la majorité des espèces appartenant au genre *Phlomis* L.

Certains flavonoides très abondants dans le genre *Phlomis* L., comme les p-coumaroyl glucosides sont utilisés comme marqueur caractéristique de la sous-famille Lamioideae incluant les genres *Anisomeles*, *Ballota*, *Galeopsis*, *Leonurus*, *Marrubium*, *Phlomis*, *Sideritis* et *Stachys* (Li et al., 2010; Marin et al., 2004; Tomas-Barberan et al., 1992).

Dans le cas des espèces *Phlomis* appartenant à la flore d'Algérie, les trois flavonoides lutéoline, lutéoline 7- β -D-glucopyranoside et chrysoeriol 7-(3''-p-E-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside sont décelés dans le screening phytochimique des extraits de feuilles de *P. biloba* (Kabouche et al., 2005). Avec l'espèce *P. herba-venti* d'autres constituants flavonoides ont été décelés à l'instar de l'apigénine, l'apigénine 7-O-glucoside (apigétrine), lutéoline et lutéoline 7-O-glucoside (Kabouche et al., 2004).

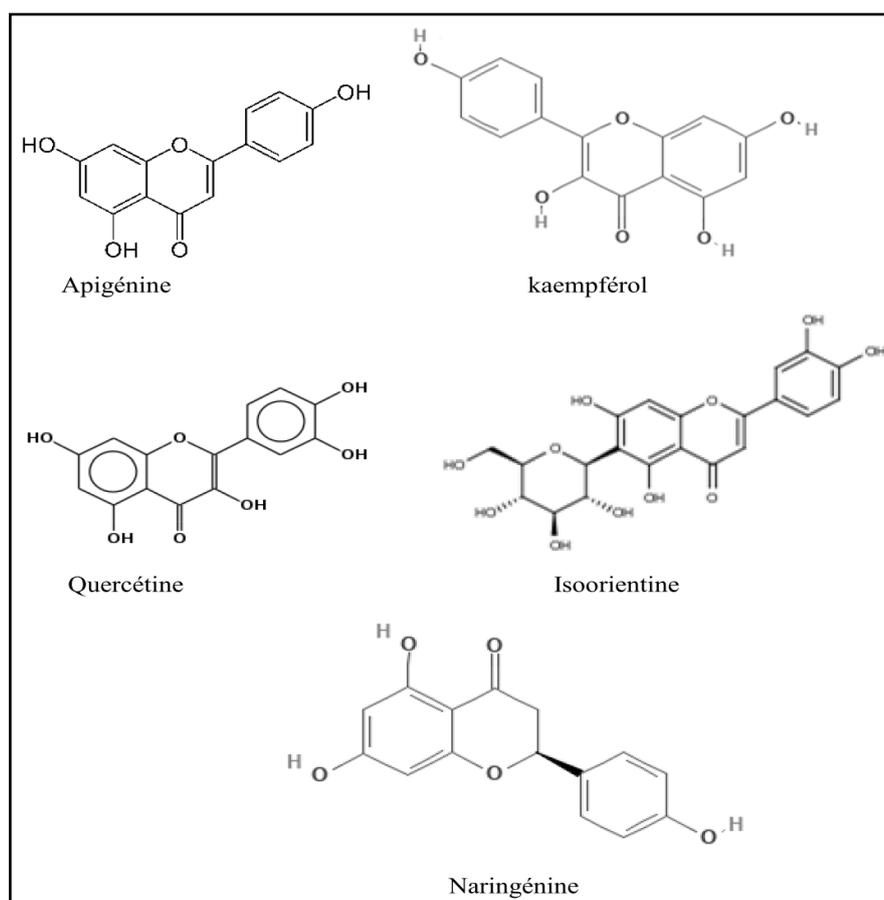


Figure 3: Les principaux flavonoides abondants chez le genre *Phlomis* L. d'après Li et al.

(2010)

4.3. Les iridoïdes

Le nom iridoïde est donné à ce groupe chimique en référence aux fourmis australiennes *Iridomyrmex* spp. à partir desquelles sont élucidées les premières structures de ce groupe l'iridomyrmécine et l'iridodial (Ghisalberti, 1998). En sensu stricto, les iridoïdes sont des monoterpènes basés sur un squelette cyclopenta[c]pyranoïde représenté par le cis-2-oxabicyclo[4.3.0]nonane nommé aussi iridane (Tietze, 1983). En pratique, le terme iridoïde désigne une large famille de composés monoterpéniques (géraniol, nérol...) fortement oxygénés abondants chez les plantes médicinales, dont les premiers constituants ont été isolés des plantes vers les années 1800s, et le nombre approximatif des iridoïdes est estimé à 600 structures (Ghisalberti, 1998).

Les investigations phytochimiques conduites sur des espèces *Phlomis* ont permis d'isoler plus de 40 iridoïdes qui sont généralement des composés oxygénés et stabilisés par des estérifications et/ou des acétylisations (Li et al., 2010). Les iridoïdes communs entre ces espèces sont shanzhiside méthyle ester, 8-O-acétylshanzhiside méthyle ester et lamiïde (Figure 4) (Limem-Ben Amor et al., 2009a).

En outre des iridoïdes communs, d'autres structures ont été isolées à partir des espèces *Phlomis*. Ainsi, les études menées par Aboutabl et al. (2002) et Mohamed et al. (2000) sur l'espèce *P. aurea* ont permis de déceler 4 iridoïdes: gentiobioside, 3-epiphlomurin, phlomurin et phlomiside. Avec l'espèce *P. rigida*, Takeda et al. (2000) ont décrit 3 iridoïdes (phlorigidosides A, B et C). D'autres molécules comme les Phloyosides I, II et III) ont été isolées de extraits obtenus de *P. younghusbandii* (Ersöz et al., 2001a) et *P. mongolica* (Ersöz et al., 2001b).

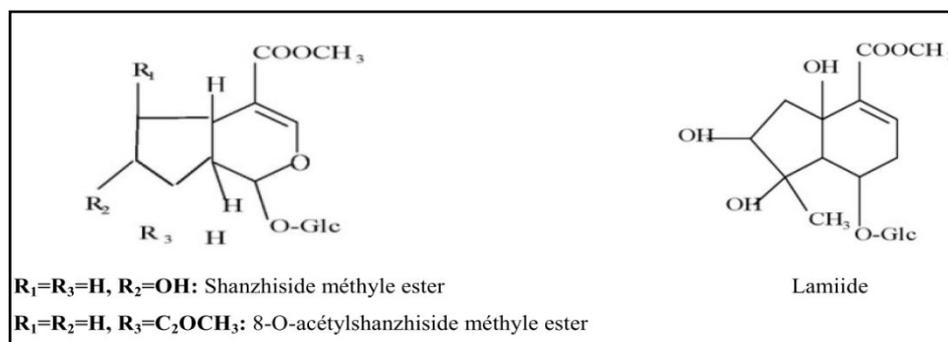


Figure 4: Les trois iridoïdes les plus répandus chez les espèces *Phlomis* d'après Limem-Ben Amor et al. (2009a).

4.4. Les Phényle-éthyle-alcool glycosides

D'après les résultats des investigations phytochimiques, les extraits des espèces *Phlomis* sont très riches aussi en cette classe chimique dénommée phényle-éthyle-alcool glycosides. D'après Li et al. (2010), on dénombre un total d'environ 27 composés appartenant à ce groupe. Certains de ces constituants, à l'instar de la molécule verbascoside (nommé aussi actéoside) et forsythoside B sont signalés comme composés communs dans diverses espèces de *Phlomis* (Tableau 3).

On peut ainsi noter la présence d'autres composés, appartenant aux phényle-éthyle-alcool glycosides, chez les espèces de *Phlomis* tel que les phlinosides (A, B, C, D et E), l'alyssonoside, et plus de 19 structures avec féruloyl ou 2-phénylethoxy lié habituellement à un cycle glycosidique à C1 et C4 respectivement (Li et al., 2010). Certains membres de ce groupe chimique tel que les constituants conjugués à l'acide caféique pourront servir de marqueurs chémotaxonomiques pour de la famille des Lamiaceae (Limem-Ben Amor et al., 2009a).

Tableau 3. Les phényle-éthyle-alcool glycosides communs dans les espèces de *Phlomis*.

Composé	Espèces	Références
Verbascoside (actéoside)	<i>P. armeniaca</i>	Saracoglu et al. (1995)
	<i>P. grandiflora</i>	Takeda et al. (1999)
	<i>P. aurea</i>	Mohamed et al. (2000)
	<i>P. longifolia</i>	Ersöz et al. (2001a)
	<i>P. tuberosa</i>	(Ersöz et al., 2001b; Calis et al., 2005)
	<i>P. samia</i>	Kyriakopoulou et al. (2001)
	<i>P. phsocalys</i>	Ersöz et al. (2003)
	<i>P. lunariifolia</i>	Calis et Kirmizibekmez (2004)
	<i>P. brunneogaleata</i>	Kirmizibekmez et al. (2004)
	<i>P. crinita</i>	Kabouche et al. (2005)
	<i>P. umbrosa</i>	Liu et al. (2007)
	<i>P. caucasica</i>	Delazar et al. (2008)
Forsythoside B	<i>P. armeniaca</i>	Saracoglu et al. (1995)
	<i>P. longifolia</i>	Ersöz et al. (2001a)
	<i>P. tuberosa</i>	Ersöz et al. (2001b), Calis et al. (2005)
	<i>P. phsocalys</i>	Ersöz et al. (2003)
	<i>P. lunariifolia</i>	Calis et Kirmizibekmez (2004)
	<i>P. brunneogaleata</i>	Kirmizibekmez et al. (2004)
	<i>P. caucasica</i>	Delazar et al. (2008)
	<i>P. lanceolata</i>	Nazemiyeh et al. (2008)
	<i>P. spinidens</i>	Takeda et al. (2001)
	<i>P. aurea</i>	Aboutabl et al. (2002)
	<i>P. pungens</i>	Ismailoglu et al. (2002)

4.5. Autres métabolites secondaires

Les principales classes chimiques qui ont été décrites jusque là chez le genre *Phlomis* ne sont pas les seuls constituants présents dans les extraits. En effet, d'autres constituants ou métabolites secondaires ont été décelées mais à des quantités minoritaire tels que les lignanes (classe phénolique), les acétophénones glycosides, les alcaloïdes, les alcools glycosides aliphatiques, les esters d'acide caféique, les composés phénoliques glycosides, les monoterpènes glycosides, les dérivés de pyrrolidinium et les esters diterpénoides glycolysés...etc. Certaines de ces constituants minoritaires, à l'instar des lignanes, on les rencontrent dans de nombreuses espèces de *Phlomis* tel que (-)-Dihydrodiconiferyl alcohol

9-O- β -D-glucopyranoside isolé de *P. lycia* (Saracoğlu et al., 2002) et *P. chimerae* (Ersöz et al., 2002a) et Syringaresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside reporté dans les extraits de *P. monocephala* (Yalçın et al., 2003) et *P. fruticosa* (Ersöz et al., 2002b).

5. Les activités biologiques et pharmacologiques des espèces *Phlomis* L.

Comme nous l'avons signalé, précédemment, dans le paragraphe traitant l'utilisation ethnobotanique, les espèces *Phlomis* sont depuis longtemps employées en médecine traditionnelle par différentes communautés dès l'antiquité. Malgré l'avancée technologique, l'humanité ne cesse d'exploiter les molécules bioactives naturelles (principes actifs) issues de plantes pour se soigner ou pour l'utiliser comme «Alicaments». Cette importance médicale est due aux différentes propriétés biologiques caractérisant ces principes actifs. Dans la partie qui suit, nous examinons un certain nombre de propriétés ou potentialités caractérisant les extraits des *Phlomis* prouvées scientifiquement par des tests *in vivo* et/ou *in vitro* ou recueillis des patrimoines thérapeutiques populaires.

5.1. Le potentiel antioxydant

Le potentiel antioxydant des végétaux (les extraits, les fruits, les légumes, etc.) joue un rôle important dans la prévention contre les maladies liées au stress oxydant telles: le processus de vieillissement, la cataracte, certains types de cancer, les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives (López et al., 2010). Les végétaux fournissent au corps les métabolites secondaires connus par leurs activités antioxydantes puissantes tel que les composés phénoliques.

Le genre *Phlomis* est l'un des groupes botaniques source de plusieurs composés phénoliques à potentiel antioxydant remarquable et prouvé par les différents essais expérimentaux (Tableau 4). En effet, de nombreuses études montrent les fortes propriétés antioxydantes des ses extraits. D'après Kyriakopoulou et al. (2001), deux constituants majoritaires: le samioside et l'actéoside, isolés de *P. samia* ont montré un effet antiradical par le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) dépassant celui de l'acide caféique standard et atteignant le pouvoir de l'acide gallique, tandis que son extrait méthanolique a enregistré une valeur quatre fois plus élevée que celle du dernier standard. Dans une autre étude, Delazar et al. (2008) ont purifié sept constituants des extraits de *P.*

caucasica, montrant par une capacité antioxydante puissante variant de 4,27 µg/mL (actéoside) à 518,6 µg/mL (Naringénine) d'IC₅₀ sur le radical DPPH.

L'investigation de l'effet antioxydant de l'extrait acétonique et méthanolique préparés des parties aériennes de *P. umbrosa* et *P. megalantha*, par utilisation de diverses méthodes d'évaluation in vitro a révélé des capacités antioxydantes excellents et comparables au potentiel de l'antioxydant synthétique puissant BHT (Butyle-Hydroxy-Toluène) (Zhang et Wong, 2009).

Les résultats, des études conduites par Sarikurkcu et al. (2015) et (2014) avec des extraits obtenus des parties aériennes de trois espèces de *Phlomis* (*P. armeniaca*, *P. nissolii* et *P. pungens* var. *pungens*) ont révélé des potentialités antioxydantes similaires aux potentialités manifestées par le BHT et le BHA (Butyle-Hydroxy-Anisole) (antioxydants synthétiques largement employés comme conservateurs des denrées alimentaires). L'efficacité antioxydante des extraits d'autres espèces de *Phlomis* comme *P. lanata* et *P. fruticosaa* été rapportée par Couladis et al. (2003). Ces mêmes auteurs notent que les extraits provenant de l'espèce *P. fruticosa* étaient moins efficaces.

Tableau 4. Propriétés antioxydantes des extraits issus de différentes espèces de *Phlomis*.

Espèce	Solvant d'extraction	Méthode d'évaluation	Action	Référence
<i>Phlomissamia</i>	méthanol	DPPH	+++	Kyriakopoulou et al. (2001)
<i>Phlomisolivieri</i>	méthanol	DPPH	+++	Delnavazi et al. (2016)
<i>P. umbrosa</i>	méthanol, acétone	DPPH, radical superoxyde, β -carotène, FRAP	+++	Zhang et Wang, (2009)
<i>P. megalantha</i>	méthanolique, acétone	DPPH, radical superoxyde, β -carotène/acide linoléique, FRAP	+++	
<i>P. armeniaca</i>	acétate d'éthyle, méthanol, eaux	Phosphomolybdène, β -carotène/acide linoléique, DPPH, ABTS, radical superoxyde, radical oxyde nitrique, CUPRAC, FRAP, chélation de fer	+++	Sarikurkcü et al. (2015)
<i>P. nissolii</i>	acétate d'éthyle, méthanol, eaux	Phosphomolybdène, β -carotène/acide linoléique, DPPH, ABTS, radical superoxyde, radical oxyde nitrique, CUPRAC, FRAP, chélation de fer	+++	Sarikurkcü et al. (2014)
<i>P. pungens</i>	acétate d'éthyle, méthanol, eaux	Phosphomolybdène, β -carotène/acide linoléique, DPPH, ABTS, radical superoxyde, radical oxyde nitrique, CUPRAC, FRAP, chélation de fer	+++	Sarikurkcü et al. (2014)
<i>P. lanata</i>	méthanol	ORAC	+++	Couladis et al. (2003)
<i>P. fruticosa</i>			++	
<i>P. lychnitis</i>	méthanol	DPPH, ABTS, radical superoxyde, inhibition de xanthine Oxydase	++	López et al. (2010)
<i>P. persica</i> Boiss.	acétate d'éthyle, butanol, éthanol	DPPH	+	Moein et al. (2007)
<i>P. bourgaei</i>	éthyle acétate, eau, méthanol, huile essentielle	β -carotène/acide linoléique	+	Sarikurkcü et al. (2013)
<i>P. crinita</i> Cavssp. <i>Mauritanica</i> Munby	acétate d'éthyle, eau, méthanol	DPPH	+++	Limem-Ben Amor et al. (2009b)

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ; ABTS: 2,2- azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; FRAP: Ferric reducing antioxidant power assay; CUPRAC: cupric ion reducing activity; ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity; + à +++: puissance d'activité par comparaison aux standards (+ inférieure, ++ : proche, +++ : similaire ou élevée).

L'espèce *P. lychnitis* L., largement consommée comme tisane en Espagne, a montré une forte activité antioxydante notamment antiradicalaire, dont les phénylpropanoïdes et les verbascosides sont désignés comme principaux responsables des potentialités antioxydantes de cette tisane populaire (López et al., 2010).

Selon de nombreux auteurs, l'activité antioxydante des membres du genre *Phlomis* pourrait être attribuée aux composés phénoliques contenus dans leurs extraits (Sarikurkcu et al., 2015; Sarikurkcu et al., 2014). Harput et al. (2006) ont testé l'action antioxydante individuelle de six constituants (acide chlorogénique, actéoside, β -OH actéoside, leucosceptoside A, samioside, et lamiide) isolés des parties aériennes de *P. syriaca*, seuls les composés phénoliques qui ont démontré un potentiel antioxydant, alors que le lamiide, un iridoïde glycoside, était inactif vis-à-vis le radical libre DPPH. Ceci confirme le rôle déterminant que jouent ces métabolites secondaires dans les propriétés antioxydantes du genre *Phlomis* L.

Chez le genre *Phlomis*, il n'y a pas que les composés phénoliques des extraits qui présentent un pouvoir antioxydant, les huiles essentielles aussi. Seulement, les actions antioxydantes de ces dernières, restent moins efficaces comparativement aux extraits. Cela est confirmé, par les résultats de l'étude menée par Sarikurkcu et al. (2013), qui ont démontré que les huiles essentielles de *P. bourgaei* inhibent l'oxydation de l'acide linoléique avec des taux moins importants que ceux obtenus avec les extraits d'hexane, de méthanol, aqueux et d'acétate d'éthyle respectivement.

D'après la littérature, les espèces du genre *Phlomis* peuvent être considérées comme une source naturelle pourvoyeuse de molécules bioactives à effet antioxydant très puissant. Les extraits des *Phlomis*, très riches en composés antioxydants, peuvent servir dans des utilisations nutritionnelles et/ou pharmaceutiques en substituant les molécules antioxydantes synthétiques (BHT) suspects par leurs possibles effets toxiques et carcinogènes (Venskutonis et al., 2004).

5.2. Pouvoir antimicrobien et antiparasitaire

Contrairement à l'activité antioxydante, les huiles essentielles extraites de diverses espèces *Phlomis* s'avèrent d'une importance notable dans l'effet antimicrobien en

comparaison aux autres extraits (organiques et aqueux). Ces huiles essentielles ont montré des actions inhibitrices vis-à-vis de nombreuses espèces bactériennes et de champignons pathogènes (Tableau 5). En effet, les huiles essentielles extraites de feuilles et de fleurs de *P. crinita* ont montré de bonnes actions bactéricides contre une gamme de bactéries Gram positif et négatif incluant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium* (Tableau 5) (Limem-Ben Amor et al., 2008). D'autres espèces bactériennes telles: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* se montrent aussi sensibles aux huiles essentielles (provenant de plusieurs espèces de *Phlomis*). Les huiles essentielles possèdent aussi d'excellent pouvoir antifongique contre plusieurs souches comme: *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*) (Tableau 5).

Contrairement aux huiles essentielles, les extraits (méthanoliques, d'acétates d'éthyles ou aqueux) n'avait pas un large spectre d'action antimicrobienne. Seules deux souches de bactéries ont été sensibles à ces extraits à savoir *S. aureus* et *E. faecalis* (Limem-Ben Amor et al., 2009b). Cela favorise bien évidemment les composés volatils versus les autres constituants dans l'inhibition bactérienne.

S'agissant du pouvoir antifongique, ce sont plutôt les extraits éthanoliques, obtenus de *P. fruticosa*, qui se montrent plus efficaces contre *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium caladosporioides* et *Phomopsis helianthi* alors que l'huile essentielle de la même espèce a inhibé seulement la croissance mycélienne des deux dernières souches (Ristiç et al., 2000). Dans d'autres études, les huiles essentielles de *P. russeliana* et *P. grandiflora* var. *grandiflora* ont inhibé la croissance de *Clostridium perfringens* (Demirci et al., 2008) et les extraits de *P. lychnis* ont montré des propriétés anti-*Rhizopus* (López et al., 2007). Malgré ces résultats, les études conduites sur les effets antifongiques des huiles ou des extraits du genre *Phlomis* restent très rares et méritent une attention particulière afin de mieux comprendre cette action.

Tableau 5. Effets antimicrobiens des extraits de plusieurs espèces du genre *Phlomis*

Espèce	microorganismes sensibles	Extraits	Référence
<i>P. crinitasp. mauritanica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	méthanol, acétate d'éthyle, aqueux, Huiles essentielles (feuilles, fleurs)	Limem-Ben Amor et al. (2009b) Limem-Ben Amor et al. (2008)
<i>P. lanata</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Huile essentielle	Couladis et al. (2000)
<i>P. fruticosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Phomopsis helianthi</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i>	Ethanol, huile essentielle	Ristić et al. (2000) ; Aligiannis et al. (2004)
<i>P. cretica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i>	Huile essentielle	Aligiannis et al. (2004)
<i>P. samia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i>	Huile essentielle	Aligiannis et al. (2004)
<i>P. russeliana</i> <i>P. grandiflora</i> var. <i>grandiflora</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	Huiles essentielles	Demirci et al. (2008)

En plus du pouvoir antibactérien et antifongique, les espèces du genre *Phlomis* ont montré aussi d'autres types d'action comme: l'activités anti-trypanosomale, l'anti-leishmaniale et l'anti-plasmodiale (Tasdemir et al., 2005; Kirmizibekmez et al., 2004). Plusieurs constituants isolés de *P. brunneogaleata* ont montré des activités antiparasitaires contre *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma bruceirhodesiense* (Kirmizibekmez et al., 2004). Dans une étude menée sur l'activité anti-plasmodiale et anti-trypanosomale de 58 plantes médicinales de la flore Turque, les trois espèces *P. kurdica*, *P. leucophracta*, et *P. russeliana* ont dévoilé des actions très puissantes. En effet, l'indice IC_{50} de la fraction $CHCl_3$, obtenu des parties aériennes, de *P. kurdica* contre *Trypanosoma bruceirhodesiense* était de l'ordre de 2,7 $\mu\text{g/mL}$, d'autre part, la meilleure activité anti-plasmodiale contre *Leishmania donovani* a été enregistrée par l'extrait de *P. kurdica* et *P. leucophracta* montrant des indices IC_{50} de l'ordre de 1,5 et 1,6 $\mu\text{g/mL}$ respectivement (Tasdemir et al., 2005).

5.3. Activité anti-diabétique

En médecine traditionnelle, certaines espèces du genre *Phlomis* sont utilisées pour ses effets anti-diabétiques. Les peuples Sud-Est et Est africains utilisent *P. ocymifolia* sous forme d'infusion ou décoction pour traiter le diabète (Habtemariam et al., 1994). Aussi, les tribus de la presqu'île égyptienne "Sinai" utilisent les extraits de feuilles de *P. aurea*, connue localement "Awarwar", pour la régulation de la glycémie chez les diabétiques (Khafagi et Dewedar, 2000).

Une recherche *in vivo* sur l'effet anti-hyperglycémique de l'extrait méthanolique de *P. anisodonta*, par le modèle "Streptozocine(STZ)-inducteur du diabète", a démontré que l'administration quotidienne de cet extrait, pendant 10 jours, régule significativement la glycémie, le taux d'insuline et arrête la perte du poids chez les rats. Ces actions ont été accompagnées par une augmentation des activités enzymatiques hépatiques de superoxyde dismutase, catalase et glutathione peroxydase, cela signifie que le pouvoir antidiabétique est due à la capacité de l'extrait de *P. anisodonta* à améliorer la puissance réductrice ferrique du plasma, de diminuer la peroxydation lipidique et d'activer les enzymes antioxydantes hépatiques (Sarkhail et al., 2007).

Dans une autre étude *in vivo* conduite sur l'extrait méthanolique de *P. persica*, par le même modèle STZ, les résultats ont été très avantageux pour le taux d'insuline, la glycémie, les activités enzymatiques hépatiques et l'arrêt de la perte du poids chez les rats (les effets commencent à apparaître à partir de deuxième jour). Le pouvoir antidiabétique de *P. persica* était similaire à celui de Glibenclamide (médicament utilisé pour le contrôle de diabète) dans la régulation de la glycémie et du taux d'insuline, alors qu'il est plus important dans la reprise de l'activité antioxydante hépatique (Sarkhail et al., 2010).

5.4. Activité anti-inflammatoire et anti-allergique

Depuis plusieurs siècles, l'espèce *P. umbrosa* est utilisée en médecine traditionnelle Coréenne pour traiter l'hémorragie, la bronchite, et autres anomalies (Shin et Lee, 2003). La même espèce est recommandée aussi par l'organisation mondiale de la santé pour ses propriétés hémostatiques (WHO, 1998). Dans la région méditerranéenne, *P. purpurea* et *P. lychnitis* ont été longtemps employées dans la médecine traditionnelle (Espagne) comme anti-inflammatoires en conditions génito-urinaires et pour des complications digestives comme les hémorroïdes (Algieri et al., 2013; Benítez et al., 2010).

Algieri et al. (2013) ont étudié l'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de *P. purpurea* et *P. lychnitis* sur des rats en exploitant le modèle d'acide tri-nitro-benzène-sulfonique (TNBS) caractérisé par des symptômes histologiques et biochimiques similaires à la maladie humaine. Les résultats de l'examen histologique ont montré un pouvoir anti-inflammatoire notable pour les deux espèces. Ce pouvoir est confirmé par des tests biochimiques montrant une réduction de l'activité myéloperoxydase du côlon qui cause l'infiltration des granulocytes neutrophiles, une augmentation de la teneur du glutathionne au côlon qui empêche l'oxydation associé au processus inflammatoire et une basse-régulation de l'expression de l'enzyme iNOS (Nitric-oxide-synthase), en addition d'une augmentation de l'expression des marqueurs d'intégrité épithéliale. Cependant, la réduction de l'expression des médiateurs de la réaction inflammatoire a été observée uniquement chez les rats traités par l'extrait de *P. purpurea*.

Les travaux de Shin et Lee (2003) et Shin et al. (2008) ont testés l'activité anti-inflammatoire et antiallergique *in vivo* de l'extrait aqueux de *P. umbrosa*. L'application de cet

extrait a empêché significativement les réactions allergiques dépendantes des mastocytes et réduit également la sécrétion des médiateurs de la réaction inflammatoire tels le facteur TNF- α (tumornecrosis factor- α), l'interleukine (IL)-6 et l'interleukine (IL)-1 β . Ces résultats supportent l'utilisation ethnobotanique de *P. umbrosa* dans le traitement des allergies et des inflammations chez l'homme.

5.5. Effet cytotoxique et antimutagène

L'activité cytotoxique et anti-mutagénique des extraits des plantes médicinales varie considérablement en fonction des deux facteurs: le modèle de cellules cancéreuse et la concentration de l'extrait végétal. D'autre part, il est impérativement nécessaire de vérifier - au préalable- l'effet toxique possible des extraits en test. Dans le cas des espèces *Phlomis*, aucun effet mutagène n'a été signalé à travers les études réalisées sur les différents modèles de cellules cancéreuses (Moein et al., 2007; Dellai et al., 2009; Uysal et al., 2016; Saracoglu et al., 1995).

L'activité cytotoxique envers divers types de cellules cancéreuses ont été mise en évidence en testant dix glycosides isolé de *P. armeniaca* (Saracoglu et al., 1995). D'autres constituants tels: verbascoside, isoverbascoside, forsythoside B et acide 3-O-cafféoylquinique méthyle ester obtenus de *P. brunneogaleata* ont aussi montré une activité cytotoxique envers des cellules cancéreuses (modèle "L6 cell-lines") (Kirmizibekmez et al., 2004).

Le pouvoir antimutagène des extraits végétaux est réalisé généralement par le test d'Ames exploitant *Salmonella typhimurium*. Les deux extraits éthyle d'acétate et méthanolique préparés des fleurs de *P. crinita* ont montré des effets antimutagène très efficaces avec des taux de protection rapprochant les 90% pour les deux souches de *S. typhimurium* (T102 et T104) (Dellai et al., 2009). Par le même test d'Ames, l'étude de Uysal et al. (2016) menée avec des extraits aqueux de *P. nissolii* et de *P. pungens*, permettent des pourcentages de protection de 59% et 32% respectivement par une concentration de 10000 μg /boîte Pétri. Dans une autre étude, le traitement des cellules fibroblastes par l'extrait éthanolique de *P. persica* a protégé significativement ces cellules contre la toxicité induite

par le peroxyde d'oxygène avec un taux de 80% (effet de la concentration 25 µg/mL) (Moein et al., 2007).

Par ailleurs, même les huiles essentielles (extrait de l'espèce *P. fruticosa*) semblent développer un potentiel antimutagène in vitro sur la souche *Escherichia coli* K12, traitée par la lumière UV et par l'ion Arg^+ (Soković et al., 2002). D'après la littérature, aucun extrait obtenu à partir des espèces de *Phlomis* n'a provoqué un effet mutagène (Dellai et al., 2009; Uysal et al., 2016).

5.6. Effet anti-ulcéreux

Les traditions ethnobotaniques des pays méditerranéens préconisent l'utilisation d'une ou de plusieurs espèces du genre *Phlomis* dans le traitement de l'ulcère et des complications gastriques (Limem-Ben Amor et al., 2009a). En Algérie, l'espèce *P. crinita* est populairement utilisée dans ces traitements sous forme d'infusion ou de décoction.

Les résultats de nombreuses études scientifiques sur le sujet confirment l'efficacité des extraits de certaines espèces de *Phlomis* pour soigner les ulcéreux. En effet, selon Gürbüz et al. (2003), qui a testé les extraits de 5 espèces de *Phlomis* de la flore Turque, il existe réellement une action anti-ulcéreuse de *P. grandiflora*. Des doses d'extraits aqueux (2670 mg/Kg) et méthanoliques (2410 mg/Kg) préparés à partir de feuilles ont permis une guérison totale des lésions gastriques (100% et 99.2% respectivement) induites par l'éthanol, sur les rats. Des résultats similaires ont été obtenus par Limem-Ben Amor et al. (2009b) en testant des extraits de *P. crinita*.

5.7. Activité anti-nociceptive

La propriété analgésique des espèces *Phlomis*, désignant la réduction de la sensation douloureuse, est confirmée par des études in vivo. L'étude de Sarkhail et al. (2003) investie sur trois espèces *P. olivieri*, *P. anisodonta* et *P. persica* suivant le test viscéral writhing a exercé une action anti-nociceptive importante traduite par une réduction significative des mouvements induites par l'acide acétique chez les rats. L'emploi d'extrait à la dose de 150 mg/Kg de *P. olivieri* et *P. anisodonta* a diminué de 60,5% et de 54,3% respectivement, de leurs mouvements. Aussi, l'emploi d'extrait issu de *P. persica*, à la dose de 100 mg/Kg, réduit

de 56,7 % cette activité. Les effets anti-nociceptifs de *P. lanceolata* sont dévoilés aussi par deux modèles test de formaline et test d'acide acétique sur des rats. Le pouvoir analgésique est confirmé lorsqu'on applique les extraits à la dose de 100 mg/Kg (Mohajer et al., 2005).

Partie I: Revue bibliographique

Chapitre 2.

Diversité génétique & Phylogénie du genre *Phlomis* L.

Chapitre 2. Diversité génétique et phylogénie du genre *Phlomis* L.

Traditionnellement, l'analyse phylogénétique et systématique des plantes médicinales (PMs) est basée sur des caractères morphologiques microscopiques et/ou macroscopiques comme pour tous les autres membres du règne Plantae. Par la suite, l'importance de la composition en métabolites secondaires, adoptée en chémotaxonomie (les races chimiques), a influé considérablement la systématique des plantes (Trindade, 2010). Cependant, la distribution de ces métabolites secondaires dans les plantes, soumise souvent à des adaptations, a généré des groupes de familles très éloignés (Wink et al., 2003), ce qui a orienté les recherches vers une combinaison de la chémotaxonomie avec la biologie moléculaire impliquant le génome nucléaire ou chloroplastique pour une meilleure compréhension de la phylogénie des PMs.

1. La diversité génétique

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des séquences géniques d'un individu, d'une population, d'une espèce ou d'une communauté. La diversité génétique est aussi définie par le niveau de similarité ou de différence dans la composition du patrimoine génétique des individus, des populations et des espèces. Elle est mesurable aux différents niveaux: de l'individu à la communauté (Dumolin-Lapègue et al., 1997).

La diversité génétique est la source principale de la biodiversité puisqu'elle mesure le degré de variation dans la séquence des gènes des populations et/ou des individus de la même espèce. Cette diversité indique la présence de plusieurs allèles pour un même gène et par conséquent la création de plusieurs génotypes (Poczai et al., 2012). Elle se distingue de la variabilité génétique qui désigne la tendance à varier des caractéristiques génétiques au sein d'un même patrimoine génétique (Laikre et al., 2009).

2. Importance de l'étude de la diversité génétique

L'étude de la diversité génétique, qui résulte essentiellement de l'hybridation, du flux de gènes, de la sélection naturelle et même de la distribution spatiale, facilite l'établissement des programmes et des stratégies permettant de maintenir cette diversité notamment pour les espèces menacées ou en voie de disparition (Poczai et al., 2012). Des

fois, la diversité de certaines espèces porte une grande importance. Elle est considérée comme un outil nécessaire pour le développement humain, dont des projets coûteux à timing de réalisation très étendu sont octroyés à cet effet, telle que les espèces sauvages fournissant des produits et conditions essentiels à la civilisation humaine. Certaines espèces sont des indicatrices de la qualité d'environnement, et d'autres sont considérées comme une clé dans le fonctionnement des écosystèmes (Ishwaran et Erdelen, 2006). D'autre part, les connaissances sur la biodiversité des espèces peuvent participer au développement économique notamment pour les espèces cultivées, afin d'améliorer la productivité agricole, par la révélation des patrimoines génétiques des variétés sauvages pour répondre aux défis futurs de l'agriculture (Poczai et al., 2012).

3. Les marqueurs génétiques

Un marqueur génétique représente n'importe quel caractère visible ou mesurable chez un être vivant. Chaque marqueur possède des caractères spécifiques favorisant ou limitant son utilisation dans une application particulière. Le marqueur doit répondre aux caractéristiques essentielles encourageant son emploi à savoir: un coût convenable permettant son utilisation et développement, ne doit pas être soumis aux variations environnementales et doit être polymorphe (peut révéler des degrés importants de variabilité allélique) et codominant dans son expression (White et al., 2007).

Originellement, les variations entre les populations et/ou les individus végétaux ont été étudiées par le biais des marqueurs phénotypiques. Plus tard, la détection de la diversité génétique est devenue plus sensible, d'abord par l'utilisation de la variation des enzymes et puis par les systèmes utilisant les marqueurs moléculaires permettant l'examen direct de la variation au niveau de la séquence héréditaire (Poczai et al., 2012).

3.1. Les marqueurs morphologiques

Les caractères morphologiques ont été les premiers marqueurs génétiques utilisés. Ils représentent généralement des mutations observées chez les plantes (Franklin, 1970). Les variations, dues à ces mutations, peuvent être de type qualitatif tel que la couleur des fleurs et la forme des feuilles ou des résistances à des maladies ou ravageurs (Ward et al., 2008). Les marqueurs sont le plus souvent dominants, mais très limités vu la rareté des mutations

morphologiques qui sont souvent nuisibles au sujet mutant ou même létale (forme récessive homozygote) ce qui complique l'analyse génétique (White et al., 2007).

3.2. Les marqueurs biochimiques

3.2.1. Les monoterpènes

Les monoterpènes sont des constituants communs des résines et des huiles essentielles des plantes. Ils font parti des hydrocarbures de la classe des terpènes produits par les plantes comme métabolites secondaires. Ils jouent un rôle très important dans le système de défense de la plante pour résister à certaines maladies (actions antimicrobiennes) ou à certains insectes nuisibles (Hanover, 1992). L'évaluation des teneurs en monoterpènes, à l'instar de α -pinène, β -pinène, myrcène, 3-carène et limonène, est quantifiable par la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Les monoterpènes sont très utiles en tant que marqueurs génétique (Hanover, 1992; Strauss et Critchfield, 1982). Ils sont exploités au début dans le volet taxonomique et évolutif des plantes. Par la suite, ils ont été utilisés dans la révélation des relations génétiques au sein des espèces présentant des variations géographiques. L'inconvénient majeur de ce type de marqueur était l'équipement d'analyse coûteux notamment aux années 1960 et 1970 ce qui a limité leur utilisation, bien que la majorité d'entre eux sont dominants dans leurs expression ce qui camoufle la variation entre le génotype homozygote (à allèles dominants) et l'hétérozygote portant l'allèle dominant (White et al., 2007).

3.2.2. Les allozymes

Les allozymes ou allo-enzymes, communément connus sous le terme "isozymes ou iso-enzymes", sont des formes alléliques d'enzymes variables. Le terme "allozyme" implique la base génétique de ces formes variables (White et al., 2007).

La procédure expérimentale d'utilisation des allozymes dans la révélation des variations génétiques est relativement facile. L'extrait protéique peut être obtenu de n'importe quelle partie de la plante puis soumis à une séparation électrophorétique (gel d'amidon). Les isozymes présentant une composition peptidique différentes possèdent généralement une charge et/ou taille différente ce qui leur attribue des positions

différentes sur le gel, cette mobilité dévoile la variation existante entre les plantes. La révélation de différentes positions des isozymes est assurée par la mise de gel dans une solution de substrat de l'enzyme additionné d'un cofacteur colorimétrique. Vu le caractère codominant des allozymes et leurs polymorphismes élevés, ils sont largement exploités dans la révélation de la diversité génétique des plantes et la surveillance de la conservation des gènes (Wheeler et Jech, 1992).

3.2.3. Les protéines totales

Dans le cas de l'analyse de la variation des protéines totales, la technique d'électrophorèse à deux dimensions sur gel de polyacrylamide (2-D PAGE) est utilisée. Contrairement aux allozymes, la technique 2-D PAGE révèle la variation entre l'ensemble des enzymes et les autres protéines de la plante. Les protéines sont révélées sous forme de spots sur le gel et le polymorphisme est détecté par le score présence (1) / absence (0) de spot dans chaque échantillon. Cette technique a la potentialité d'analyser plusieurs locus sur un même gel, mais ces marqueurs sont souvent dominant (White et al., 2007).

3.3. Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont des petites séquences d'ADN génomique qui représentent des variations et/ou des mutations dans la séquence d'ADN de différents individus (Singh et Singh, 2015). Si cette variation est liée à un gène d'intérêt, ces marqueurs peuvent être utilisés dans la détection de polymorphisme entre les allèles ou les génotypes de ce gène (Jiang, 2017).

Plusieurs systèmes de marqueurs moléculaires sont développés dès les années 1980 en parallèle avec le progrès des technologies de révélation récapitulées en trois méthodes essentielles: la technique d'hybridation ADN/ADN ou ARN/ADN, la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) et la technologie de séquençage.

3.3.1. Les marqueurs basés sur l'hybridation d'ADN

3.3.1.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les premiers marqueurs moléculaires RFLP développés au début des années 1980 sont de type "hybridation ADN/ADN" (Botstein et al., 1980). Dans ce système, l'ADN génomique est digéré par des endonucléases (restrictions) qui réduisent le génome gigantesque à un pool de fragments à différentes tailles suivi d'une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. La révélation des positions des fragments est possible sur le même gel par l'emploi du bromure d'éthidium (BET) (marqueur non radioactif des acides nucléiques), quoique les fragments discrets sont généralement cachés vu leur nombre important. Pour résoudre ce problème, l'ADN fractionné est dénaturé (à un seul brin) puis transféré sur une membrane (nitrocellulose ou nylon) par le processus de Southern blotting, dont la révélation est assurée par radiographie après hybridation d'une amorce d'ADN monobrin radioactive ou fluorescente avec les fragments transférés sur la membrane (Jiang, 2017). Vu le long protocole des multi-étapes et la nécessité de la radioactivité dans la révélation de leurs produits, la technique RFLP a perdu son importance notamment avec l'innovation de la technologie PCR (Mohler et Schwarz, 2005).

3.3.2. Les marqueurs basés sur la technique PCR

La PCR est une découverte biologique fondamentale au 20^{ème} siècle par son inventeur Kerry Mullis (Mullis, 1990). Avant cette invention, la manipulation d'un fragment d'ADN particulier nécessite des étapes longues et délicates passant par son clonage et amplification dans un vecteur tel que les plasmides, tandis que la PCR a permis la production d'un nombre illimité de copies du fragment choisi dans un délai court et sans passage par le clonage.

En général, la technique PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN de l'ordre de 0,1 à 10 kpb (kilospairs de base), bien que certaines techniques puissent amplifier des tailles atteignant les 40 kpb. La quantité des produits dépend des substrats mis en réaction. L'amorce (fragment d'ADN complémentaire à la région à amplifier) et l'enzyme d'ADN polymérase (une enzyme originellement obtenue de *Thermus aquaticus*) sont les composantes clé de l'amplification. La PCR est réalisée dans des volumes de 10 à 200 µL

dans un thermocycleur à cycles répétitifs de températures (chauffage et refroidissement) (Figure 5) (Jiang, 2017).

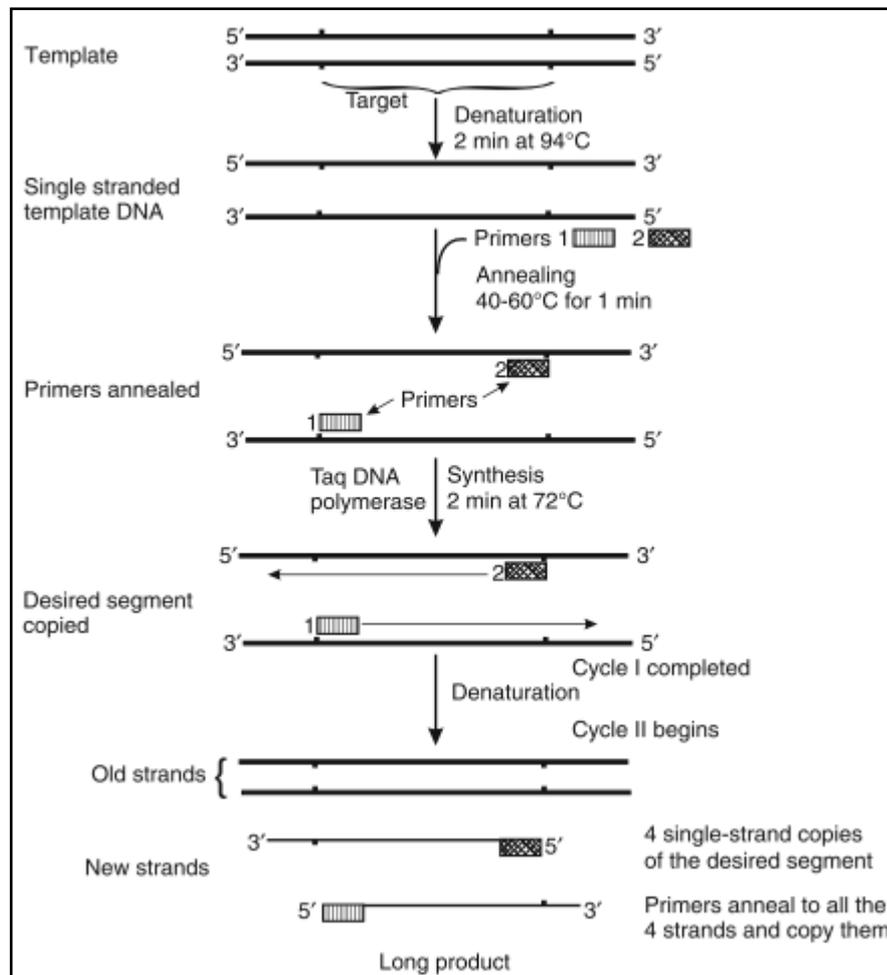


Figure 5: La réaction en chaîne polymérase (PCR) permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique dans un génome d'après Singh et Singh (2015).

3.3.2.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Les marqueurs RAPD est le premier marqueur basé sur la PCR, ils sont développés indépendamment par Welsh et McClelland (1990) et Williams et al. (1990). Ce type de marqueur est facile à utiliser car il ne nécessite pas d'informations préalables sur la séquence d'ADN pour établir les amorces adéquates.

La réaction PCR dans une analyse RAPD n'exige qu'une petite quantité d'ADN à amplifier (généralement moins de 10 nanogrammes) et des amorces universelles simples brin à séquences aléatoires d'ordre de 10 paires de base (pb). Ce marqueur a la potentialité

d'amplifier aléatoirement l'ADN génomique cible ce qui révèle tout possible polymorphisme entre individus, dont l'amplification aura lieu dans les fragments d'ADN génomique complémentaire à l'amorce utilisée (White et al., 2007).

Une nouvelle approche est développée pour la technique RAPD nommée DNA Amplification Fingerprinting (DAF) qui consiste à utiliser plusieurs courtes amorces de l'ordre de 5 pb pour produire une matrice complexe de bandes séparées par la suite électrophorétiquement sur gel de polyacrylamide (Caetano-Anollés et al., 1991). La révélation de polymorphisme dans cette approche peut être soutenue par des endonucléases (Caetano-Anollés et al., 1993).

La technique RAPD est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Néanmoins, elle manque de reproductibilité puisqu'elle est très sensible à la concentration d'ADN et aux conditions d'amplification (Najimi et al., 2003).

3.3.2.2. Microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat)

Les microsatellites, dénommés aussi marqueurs SSR, STR (short tandem repeats) ou STMS (sequence-tagged microsatellite sites) sont des petits fragments d'ADN, généralement de l'ordre de 2 à 5 pb, répétés en tandem dans le génome. Les bons SSRs ont habituellement une répétition de motif nucléotidique de 9 à 30 fois. Ces marqueurs sont développés, initialement, pour établir les cartes génétiques humaines (Weber et May, 1989). Ils dérivent généralement des régions non codantes et/ou anonymes du génome. Dans le cas des plantes, les répétitions di-, tri-, et tetra-nucléotides, telles que $(AT)_n$, $(AGT)_n$ et $(AGAT)_n$, sont souvent distribuées tout au long du génome, dont le polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite (Jiang, 2017). Les séquences flanquantes ces éléments répétés permettent de définir les amorces qui seront utilisées pour l'amplification PCR. L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'acrylamide. C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur (Najimi et al., 2003).

En pratique, les SSRs constituent de bons marqueurs moléculaires en termes de reproductibilité et codominance, mais leur caractérisation initiale nécessite un investissement

relativement considérable. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage afin de créer une base de données des séquences de ces éléments répétés (Ostrander et al., 1992).

3.3.2.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Depuis l'invention de la technique des marqueurs AFLPs par Vos et al. (1995), elle est largement exploitée dans les études de la diversité génétique des plantes bien que d'autres organismes. Les AFLPs ressemblent au RAPDs de point de vue amorce arbitraire, mais ils semblent être plus répétables et aussi similaires aux RFLPs en termes de surveillance des sites de restriction dans les génomes cibles (White et al., 2007).

La procédure AFLP repose sur plusieurs étapes, l'ADN génomique purifié est d'abord coupé par deux enzymes de restriction (généralement EcoRI et MseI) ayant des sites de reconnaissance respectivement de 6 et 4 bases, suivie par ligation des adaptateurs (séquence connue de 10 à 15 bases) compatibles aux extrémités cohésives des sites de restriction. Une première amplification, dite pré-sélective, amplifie les fragments d'ADN à l'aide d'amorces correspondant à la séquence des adaptateurs et du site de restriction additionné en 3' d'une base définie arbitrairement. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières additionnées de 1, 2 ou 3 bases supplémentaires à leur extrémité 3' (les nucléotides de sélection). Pour chaque nucléotide de sélection additionné, la probabilité des fragments à amplifier réduit à 1/16 ($\frac{1}{4} \times \frac{1}{4}$) de la mixture totale. Les produits de l'amplification finale sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, dont la révélation peut être assurée par coloration au nitrate d'argent ou par marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de la seconde amplification (Singh et Singh, 2015).

Le polymorphisme dans le système AFLP est dû généralement aux mutations (souvent un seul nucléotide) dans les sites de restriction ou dans les nucléotides adjacents qui s'hybrident avec l'amorce AFLP. Les polymorphismes peuvent également résulter des suppressions, des insertions et des réarrangements d'ordre affectant la présence des sites de restriction et/ou des séquences adjacentes. Ce système est jugé comme étant le plus informatif sur l'ensemble des marqueurs moléculaires, dont ils génèrent entre 50 à 100

fragments de restriction dans chaque réaction (un nombre important de loci). En outre, les AFLPs permettent aussi de distinguer entre les génotypes homozygotes et hétérozygotes par comparaison de l'intensité des bandes générées, malgré qu'ils sont généralement dominants (Trindade, 2010)

3.3.2.4. SNP (Single Nucleotid Polymorphism)

Le marqueur SNP détecte la différence la plus simple entre les séquences d'ADN de deux individus. Il décrit la variation entre les séquences d'ADN des membres de la même espèce. Ce marqueur moléculaire génère un polymorphisme résultant d'insertions ou de délétions (indels) des nucléotides, des mutations ponctuelles ou substitutions (transitions: C/T ou G/A et transversions: C/G, A/T, C/A, or T/G). Cette variation peut être révélée aussi par alignement des régions similaires des génomes ciblés. Les marqueurs SNPs sont extrêmement abondants dans les génomes (environ un seul chaque 100 à 300 pb chez les plantes) et répartis tout au long du génome (régions codantes et non codantes, inter-génique) avec une dominance claire dans les régions non codantes (Jiang, 2017; Singh et Singh, 2015).

Les SNPs, marqueurs codominants, s'avèrent très prometteurs pour les utilisations à grande échelle et peuvent être considérés comme les marqueurs moléculaires de futur vue la grande possibilité de robotisation, notamment avec l'extension quotidienne de la base des données des génomes séquencés et le développement de nouvelles générations de technologies de séquençage (Gupta et al., 2001; Rafalski, 2002). Cependant, l'application de cette approche reste limitée à l'heure actuelle par son coût élevé et l'exigence d'ADN de qualité, d'équipements et des techniques performants (Najimi et al., 2003).

3.3.2.5. ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

La méthode ISSR est l'une des plus avantageuses techniques d'analyse de la diversité génétique. Elle est hautement reproductible et génère un polymorphisme abondant entre les individus sans besoin de connaissances préalables sur les génomes cibles. Ses amorces universelles sont communes entre plusieurs espèces végétales et animales qui amplifient des régions piégées entre deux SSRs. Le protocole des ISSRs est relativement simple avec moins d'étapes expérimentales comparativement aux RFLPs (Figure 6) et des résultats

répétables et plus fiables que les RAPDs, dont une seule amorce peut amplifier jusqu'au 80 loci (multilocus) simultanément (Luque et al., 2002) et moins coûteux que les AFLPs (Ng et Tan, 2015) (Tableau 6). Ces éléments trouvent une large gamme d'applications génétiques à savoir la génétique des populations, l'hybridation et la localisation des gènes (Wink, 2006).

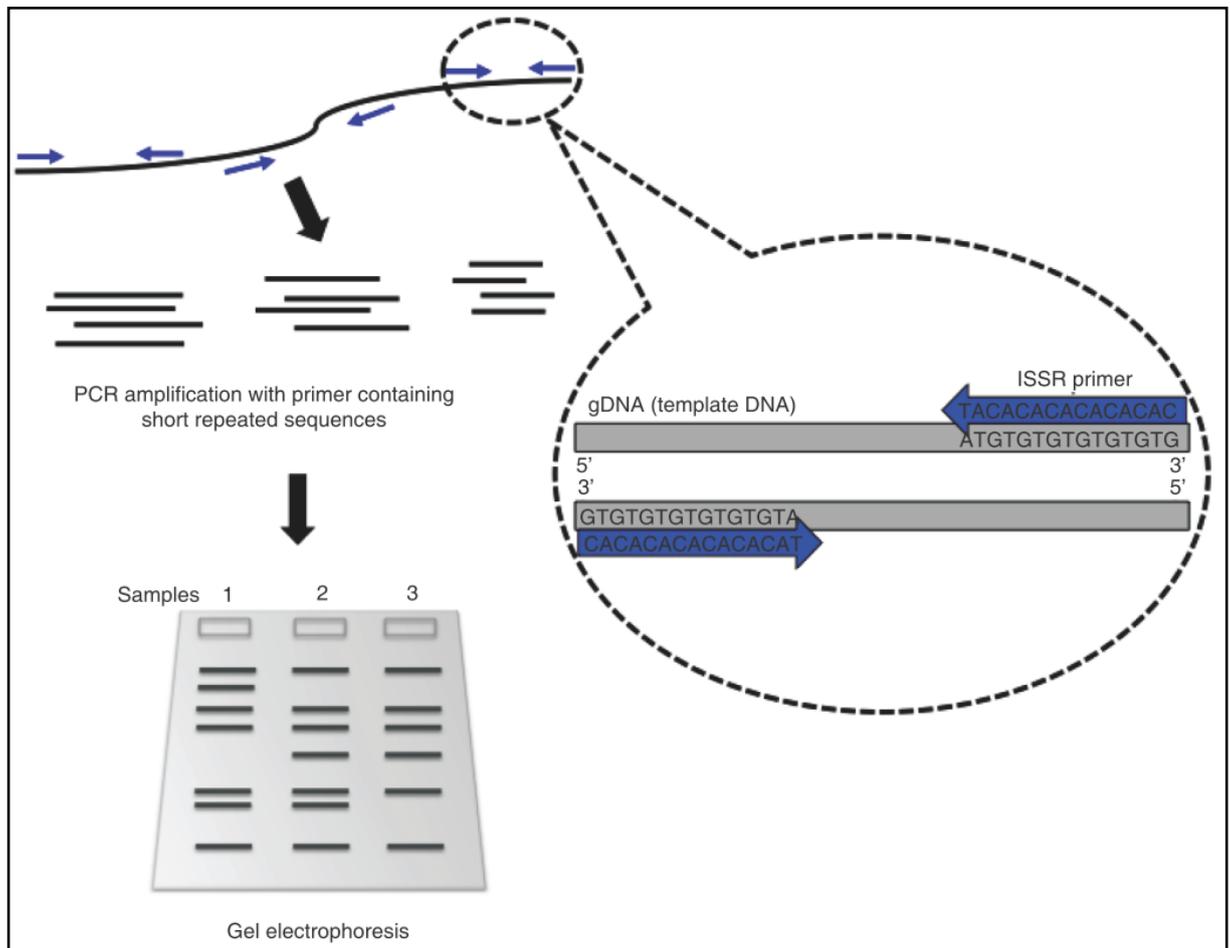


Figure 6: Concept d'analyse par une amorce ISSR (Ng et Tan, 2015).

Comme la majorité des marqueurs moléculaires, l'ADN génomique obtenu par extraction conventionnelle est largement suffisant pour la technique ISSR-PCR, quoique la méthode aux kits commerciaux soit préférable pour une bonne purification. Dans ce système, la réaction PCR n'exige que des petites quantités d'ADN allant de 10 à 50 ng (Ng et Tan, 2015) avec des amorces de 16 à 25 pb qui comprennent trois formes distinctives: des amorces à motif répétitif seulement tel que 5'-(AC)₈-3', une autre forme ancrée à l'extrémité 5' avec une ou plusieurs nucléotides (qui n'appartiennent pas au motif répétitif) tel que 5'-GA(AC)₈-3' et la troisième forme consiste les amorces ancrées à l'extrémité 3' (exemple: 5'-

(AC)₈AG-3'). La température d'hybridation des ces amorces varie généralement de 45 à 60°C et les produits d'amplification sont séparés électrophorétiquement sur gel d'agarose à concentration variable (Reddy et al., 2002).

L'inconvénient majeur des ISSRs, bien que les RAPDs et les AFLPs (Tableau 6), est leur caractère dominant qui ne permet pas de distinguer clairement entre l'homozygotie et l'hétérozygotie. C'est pour cette raison que certaines revues scientifiques dédiées à la génétique de conservation et écologique, à l'instar de *Molecular Ecology* (ISSN 1365-294X) et *Conservation Genetics* (ISSN 1572-9737), ont annoncé leur refus d'expertiser et/ou de publier des travaux de diversité génétique utilisant ce type de marqueurs.

L'avis des revues précédentes reste un point de vue particulier, puisque les marqueurs moléculaires dominants persistent comme un outil indispensable dans la révélation initiale de la variation génétique de différentes espèces (animales et végétales), ce qui est traduit par le nombre de documents publiés sur cet objectif qui dépasse par exemple 1596 data dans la base Elsevier entre 2008-2018 pour les ISSRs seulement (Elsevier, 2018b).

Tableau 6. Comparaison de caractéristiques et convenance d'application des marqueurs moléculaires les plus utilisés chez les plantes d'après Ng et Tan, (2015) et Jiang, (2017).

Marqueur	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP	ISSR
Caractère ou application						
Abondance génomique	Elevée	Elevée	Elevée	Modérée à élevée	Très élevée	Elevée
Couverture du génome	Partielle (régions codantes)	Totalité du génome	Totalité du génome	Totalité du génome	Totalité du génome	Totalité du génome
Expression	Codominant	Dominant	Dominant-codominant	Codominant	Codominant	Dominant
Nombre de loci	Faible (<1000)	Faible (<1000)	Modéré (1000s)	Elevé (1000s – 10000s)	Très élevé (>100000)	Elevé (1000s – 10000s)
Taux de polymorphisme	Modéré	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée
Clonage ou séquençage	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Non
Détection basée sur PCR	Généralement non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Détection par radioactivité	Généralement oui	Non	Oui / non	Généralement non	Non	Non
Reproductibilité	Elevée	Faible	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée
Quantité d'ADN requise	Importante (5-50 µg)	Faible (0,01-0,1 µg)	Modérée (0,5-1,0 µg)	Faible (0.05-0,12 µg)	Faible (≤0.05 µg)	Faible (0,01-0,05 µg)
Qualité d'ADN requise	Elevée	Modérée	Elevée	Modérée à élevée	Elevée	Modérée à élevée
Durée de réalisation	Longue	Courte	Moyenne	Courte	Courte	Courte
Coût par analyse	Cher	Faible	Moyen	Faible	Faible	Faible

3.3.2.6. Autres marqueurs (ITS, SCAR, STS)

Il existe d'autres marqueurs moléculaires exploitables dans les études de polymorphisme génétique à l'instar des ITSs (Internal Transcribed Spacer) à multiple applications dans les investigations taxonomiques, phylogénétiques et biogéographiques surtout au sein du règne des mycètes (Mycota) (Baldwin et al., 1995). En plus de la conversion des marqueurs de type RFLP, AFLP et RAPD en marqueurs PCR de type SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) (Paran et Michelmore, 1993) ou STS (Sequence Tagged Site) (Olson et al., 1989) qui correspondent à des marqueurs simples, rapides, reproductibles, co-dominants, non radioactifs et peu coûteux (Hernandez et al., 1999).

4. Exploitation de l'approche génomique pour l'étude des PMs

Les techniques moléculaires sont en progrès continu soit dans la préparation de l'ADN (par exemple l'optimisation des kits d'extraction), le séquençage des gènes, l'alignement des séquences y compris les génomes entiers, l'innovation de nouveaux logiciels informatiques facilitant l'analyse et l'interprétation des données...etc. Ces moyens et techniques sont regroupés aujourd'hui dans la nouvelle discipline "génomique" qui concerne l'étude de la totalité de génome incluant les séquences codantes et non codantes d'un être vivant (Trindade, 2010).

Dans le règne des plantes, la recherche en génomique a achevé une étape primordiale dans les études phylogénétiques des espèces végétales. Elle s'intéresse au séquençage d'une multitude d'espèces à l'instar de *Salvia multirhiza* prise comme modèle des plantes aromatique et médicinales (Xu et al., 2016; Song et al., 2013). La prochaine étape qui suit est chargée d'expliquer les relations phylogénétiques entre les différentes espèces et groupes végétaux par combinaison des données moléculaires avec les connaissances botaniques traditionnelles basées essentiellement sur les caractéristiques morphologiques. L'objectif final de l'approche génomique est de déterminer les fonctions biochimiques (notamment les métabolites secondaires largement diversifiées et recherchées) et cellulaires de chaque gène par le biais de l'étude de transcriptome (transcriptomique: les ARN messagers) et protéome (protéomique: les profils protéiques obtenus) étroitement liées à la génomique (Daly et al., 2001).

Les études génomiques et protéomiques des PMs contribuent largement au domaine des métabolites secondaires. Ils permettent d'identifier les enzymes, les substrats et les produits impliqués dans le métabolisme secondaire des PMs, dont une part importante des gènes des plantes codent pour des enzymes de métabolisme primaire, qui a reçu un intérêt suffisant des recherches scientifiques résultant à une large connaissance des ses enzymes, et de métabolisme secondaire plus au moins ignoré vu sa complexité liée surtout à sa diversité biochimique où une proportion très limitée est élucidée (Trindade, 2010).

5. La diversité génétique du genre *Phlomis* L.

La mesure de la diversité génétique inter et intraspécifique des espèces végétales est un outil important dans la délimitation, la conservation des espèces et la construction des relations phylogénétiques entre les membres d'un même taxon botanique (famille, genre, espèce) ou les individus d'une même population. Dans le cas du genre *Phlomis* L., les études de diversité génétique par les marqueurs moléculaires sont très limitées (Albaladejo et al., 2005; Evren et al., 2015; Georgescu et al., 2015; Yüzbaşıoğlu et Dadandi, 2008; Yüzbaşıoğlu et al., 2008) comparativement aux anciennes études exploitant des critères morphologiques, biochimiques, anatomiques, palynologiques et cytologiques (Albaladejo et al., 2004; Aparicio et al., 2000; Hedge, 1986; Huber-Morath, 1982).

Yüzbaşıoğlu et Dadandi, (2008) ont étudié la diversité génétique interspécifique par les marqueurs RAPD de 11 espèces (20 accessions) de la flore Turque appartenant à la sous-section *Dendrophlomis* Bentham. L'étude en question a montré une convenance entre les résultats de l'analyse moléculaire avec la phylogénie basée sur la morphologie florale, dont les groupes générés par l'analyse RAPD renferment des espèces partageant relativement certains critères floraux (calice) (Figure 7).

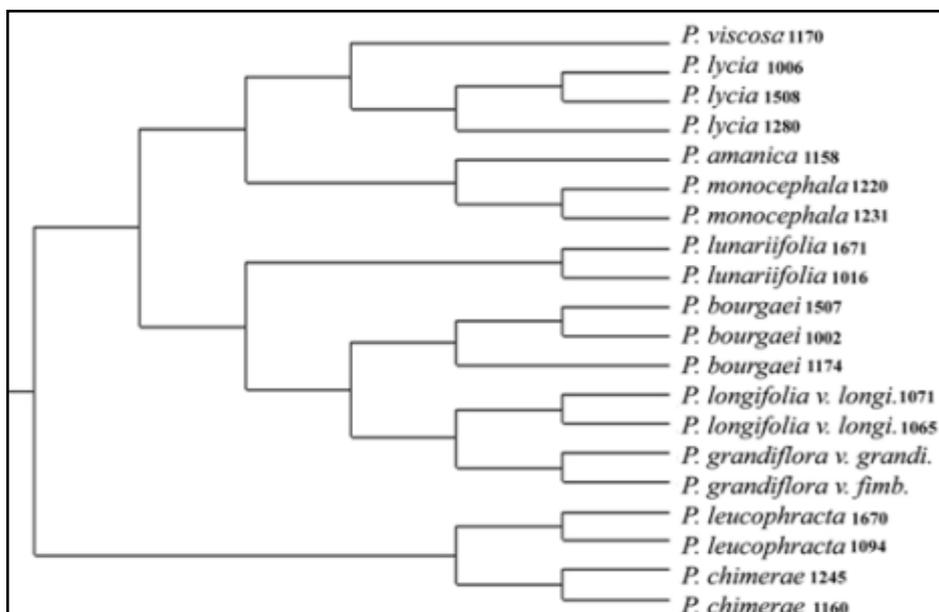


Figure 7: analyse Cluster générée par les marqueurs RAPD de 11 espèces de la sous-section *Dendrophlomis* Bentham (Yüzbaşıoğlu et Dadandi, 2008). Les résultats ont réparti les espèces en deux groupes, dont le deuxième groupe rassemble *P. chimerae* et *P. leucophracta* qui partagent plusieurs similarités morphologiques.

Evren et al. (2015) ont confronté les résultats d'une analyse moléculaire fondée sur des RAPDs et ISSRs aux variations morphologiques de *P. oppositiflora*, *P. kurdica*, *P. capitata*, *P. armeniaca* et les deux hybrides *P. kurdica* × *oppositiflora*, et *P. kurdica* × *capitata*. Les résultats ont révélé l'inefficacité des marqueurs morphologiques dans l'analyse phylogénétique du genre *Phlomis* L., vu le taux d'hybridation et d'introgession élevé au sein de ce genre, et une divergence remarquable entre les espèces et leurs hybrides qui peuvent constituer de nouvelles espèces à long terme.

La diversité génétique des membres du genre *Phlomis* L. appartenant à la flore Crétoise (l'île de Crète, Grèce), représentée par trois espèces *P. cretica* C. Presl., *P. fruticosa* L., et *P. lanata* Willd. et trois hybrides *P. × cytherea* Rech. f. (*P. cretica* × *P. fruticosa*), *P. × commixta* Rech.f. (*P. cretica* × *P. lanata*) et *P. × sieberi* Vierh. (*P. fruticosa* × *P. lanata*), a été étudiée par le biais des trois marqueurs moléculaires ITS, *trnH-psbA* (chloroplastique) et AFLP. Les résultats de cette étude ont réaffirmé la variation élevée entre les espèces de *Phlomis* L. malgré la surface d'échantillonnage relativement restreinte (8336 Km²), et ils ont approuvé aussi la potentialité des marqueurs moléculaires dans l'identification des taxons de ce genre (Georgescu et al., 2015).

6. Phylogénie du genre *Phlomis* L.

D'après la seule et la plus large étude phylogénétique moléculaire du genre *Phlomis* L. conduite par Mathiesen et al. (2011), les deux sections de ce genre à savoir: *Phlomoides* et *Phlomis*, possèdent en commun un même ancêtre originaire d'Asie centrale qui a été dispersé dans les deux grands centres de diversification: la zone méditerranéenne et le Sud d'Asie. Cette investigation a mentionné aussi que le clade méditerranéen (la section *Phlomis*) pouvait avoir un ancêtre différent originaire de Turquie / Chypre si cette région est considérée comme indépendante de la flore méditerranéenne.

Vu la variation remarquée au sein du genre *Phlomis* L., due à la fréquence élevée d'hybridation et d'introgession (Albaladejo et Aparacio, 2007) et la présence des ressemblances, essentiellement morphologiques, aux autres genres de la sous famille *Lamioideae*, sa systématique a subi plusieurs révisions suite à des études d'évaluation de sa monophylie et phylogénie.

6.1. Aperçu sur la phylogénie de la sous famille Lamioideae

Depuis les travaux de Harley et al. (2004), la famille des Lamiaceae est divisée systématiquement en sept sous familles comprenant les Viticoideae, les Symphorematoideae, les Ajugoideae, les Prostantheroideae, les Nepetoideae, les Scutellarioideae et les Lamioideae. Cette dernière est considérée comme la deuxième plus large sous famille contenant 63 genres et 1260 espèces. Les relations phylogénétiques entre les membres de Lamioideae sont investies dans l'étude de Scheen et al. (2010) basée sur trois marqueurs plastides dans 159 espèces distribuées sur 59 genres. L'étude a identifié 9 tribus, quoi que 16 genres n'ont pas été catégorisés dans des tribus vu le manque d'informations moléculaires et 3 autres ont été classés en se basant seulement sur leur morphologie (*Colebrookea*) ou sur une combinaison de leur morphologie avec des données moléculaires limitées (*Eurysolen*, *Lagopsis*).

Malgré les progrès récent en terme de recherche scientifique conduite sur la sous famille des Lamioideae, elle reste la moins soumise aux études phylogénétiques comparativement aux autres sous familles, dont seulement certains groupes sont étudiés incluant la tribu Lamieae (Ryding 2003), la tribu Leucadeae (Ryding 1998; Scheen et Albert, 2009), les labiés indigènes à Hawaï (Lindqvist et Albert, 2002; Lindqvist et al., 2003), la tribu Phlomoideae (Mathiesen et al., 2011; Pan, 2009; Ryding, 2008), *Sideritis* (Barber et al., 2000, 2002, 2007), et la tribu *Synandreae* (Scheen et al., 2008).

6.2. Les révisions phylogénétiques du genre *Phlomis* L.

Phlomis L. est l'un des genres les plus larges de la sous-famille Lamioideae. En 1794, le botaniste allemand Conrad Moench a remarqué des différences morphologiques, dont il était le seul marqueur disponible, entre les membres du groupe *Phlomis* proposant par la suite de le fractionner en deux genres *Phlomis* et *Phlomoides*. Ces différences morphologiques sont prouvées prochainement dans les travaux de célèbres botanistes tel que Bentham, Boissier, Briquet, Link, Kamelin et Makhmedov qui ont désigné ces deux groupes en tant que deux sections du même genre *Phlomis* ou deux genres distinctifs (Mathiesen et al., 2011).

La séparation des espèces *Phlomis* L. en deux sections est justifiée par plusieurs caractères distinctifs pour chaque groupe. Les espèces placées dans la section *Phlomis* sont des arbustes ou sous-arbustes alors que la section *Phlomoides* ne compte que des herbes. Les fleurs sessiles disposés en verticille pour les deux groupes portent une lèvre inférieure compressée chez les membres *Phlomis* tandis que chez les membres *Phlomoides* cette lèvre n'est pas compressée mais elle présente une inégalité dans les marges très denses en poils. Le troisième critère dissemblable concerne aussi la lèvre inférieure trilobée chez les deux groupes avec un lobe central large comparativement aux lobes latéraux présentant une taille inférieure plus distinctive chez les espèces du groupe *Phlomis*. Le fruit des espèces *Phlomis* est un akène généralement glabre ou pubescent mais couvert en poils dans les espèces appartenant à *Phlomoides* (Azizian et Moore 1982; Mathiesen et al., 2011; Ryding 2008). Les deux groupes sont distinctifs aussi au niveau chromosomique, dont les espèces *Phlomis* sont généralement $2n=20$ tandis que les espèces *Phlomoides* sont $2n=22$ (Azizian et Cutler, 1982).

Les études portant sur les caractéristiques morphologiques, anatomiques, cytologiques, phytochimiques et palynologiques du genre *Phlomis* L. ont montré que ses caractéristiques sont similaires à un autre genre de la même sous-famille Lamioideae nommé *Eremostachys* Bunge notamment avec la section *Phlomoides* (Azizian et Cutler 1982; Azizian et Moore 1982; Ryding 2008). Cette ressemblance peut être totale (100%) pour certains aspects telle que la caractéristique anatomique qui permet de faire une seule description pour les deux genres (Azizian et Cutler 1982).

Dans les travaux de certains botanistes, *Phlomis* et *Phlomoides* sont désignés comme des genres distincts avec 90 et 140 espèces respectivement (Adylov et al., 1986, 1987; Kamelin et Makhmedov 1990a,b; Makhmedov, 1990) et l'ancien genre *Eremostachys* est partagé en trois genres *Phlomoides* Moench (restauré des travaux de Moench), *Eremostachys* Bunge (adopté des travaux de Bunge) et un nouveau genre *Paraeremostachys* Adylov, Kamelin et Makhmadov dont ces genres incluent successivement 75, 9 et 15 espèces (Adylov et al., 1986). Cependant, le nouveau genre nommé *Paraeremostachys* est considéré par la suite inacceptable en systématique botanique à cause de l'homonymie (même nom) avec *Eremostachys* (Hedge, 1990).

Actuellement, le genre *Phlomis* L. suit la systématique phylogénétique (APG IV) mentionnée dans le tableau suivant (USDA, 2018).

Tableau 7. Place du genre *Phlomis* dans la systématique botanique.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous famille	Lamioideae
Genre	<i>Phlomis</i> L.

Partie II: Matériel et méthodes

Partie II: Matériel et Méthodes

Chapitre 3.

Étude phytochimique et biologique

Chapitre 3. Étude phytochimique et biologique

1. Matériel végétal

1.1. Description botanique

L'espèce *Phlomis biloba* Desf. (appelée aussi *P. crinita*) est une plante pouvant atteindre des tailles moyennes allant de 60 à 90 cm (Figure 8). Elle est caractérisée par une tige quadrangulaire. Les feuilles sont lancéolées, opposées et tomenteuses (Desfontaine, 1798). Les fleurs sont groupées en verticilles axillaires à corolle jaune dorée tubuleuse, bilabée: lèvre supérieure en casque, ample, tomenteuse; lèvre inférieure trilobée et étalée et un calice tubuleux ou campanulé, généralement plissé, à 5 dents.



Figure 8: La partie aérienne de *Phlomis biloba* Desf.

1.2. Récolte

Les feuilles et les fleurs de six populations de *P. biloba* Desf., sont récoltées séparément dans des sacs en papier au moment de floraison (début du mois de Mai 2016) de 6 sites

situés dans la wilaya de Chlef (Figure 9). Les feuilles et les fleurs sont séchées à l'ombre dans un endroit aéré à une température de 29 ± 2 °C et un taux d'humidité de 12–60% pendant une durée de séchage de 7 jours, puis broyées finement et mises dans des flacons sombres et hermétiquement fermés.

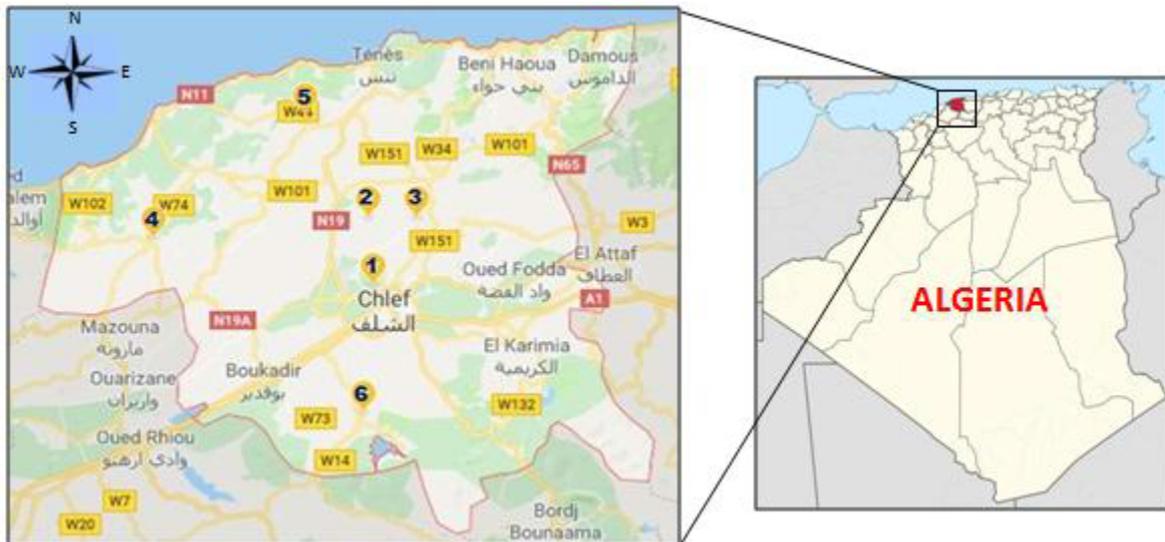


Figure 9: Les lieux de récolte des populations. (1) SidiAmer; (2) Medjadja; (3) El-Nakhla; (4) Taougrite; (5) Abou El Hassen; (6) Ouled ben Abdelkader.

2. Les produits chimiques

Les réactifs et les solvants utilisés durant l'analyse phytochimique sont: le méthanol de grade HPLC (VWR International, Leuven, Belgique), le chloroforme (Grade HPLC), le carbonate de sodium, le trichlorure d'aluminium, l'acétate de sodium, l'acide gallique, la quercétine, le 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), le hydroxytoluènebutylé (BHT), l'alpha-tocophérol, la β -carotène et l'acide linoléique parvenus de Sigma-Aldrich GmbH (Stemheim, Germany). Le réactif Folin-Ciocalteu est obtenu de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO) alors que l'acide ascorbique est d'origine de Biochem Chemopharma (Cosne-cours-sur-Loire, France).

3. Préparation des extraits

3.1. Les extraits bruts

La préparation de l'extrait est effectuée selon la méthode décrite par Das et al. (2013) avec quelques modifications. En bref, une quantité de 500 mg de poudre fine des feuilles et des fleurs de chaque population, préparée préalablement, est mise en macération dans 100 mL de méthanol (80%) à une température ambiante pendant 24 heures sous agitation continue (WIS-10, Daihan Scientific Co. Ltd., Korea). Le mélange est filtré sur papier Whatman N°1 (0,55 mm), le résidu est épuisé par deux lavages successifs avec 10 mL de méthanol 80%, puis concentré par évaporation à l'aide d'un rotavapeur (Büchi, Flawil, Switzerland) suivi de lyophilisation (Christ Alpha 1-4 LD plus, Germany) pour éliminer le reste de l'eau. Le résidu sec brut est récupéré par méthanol puis conservé à 4 °C à l'abri de la lumière et sert aux différentes analyses.

Calcul de rendement: Le rendement en extrait brut est exprimé en pourcentage (% poids/poids) par rapport au poids initial du matériel végétal mis en macération, selon la formule suivante:

$$\text{Rendement (\% p/p)} = \left(\frac{\text{poids d'extrait (mg)}}{\text{poids de poudre végétal (mg)}} \right) \times 100$$

3.2. Les extraits raffinés (selon la taille des particules)

Ce test expérimental, visant l'étude de l'impact de l'élimination des particules des extraits des populations de *P. biloba* Desf., est réalisé sur les feuilles et les fleurs de la population de Sidi Amer.

Afin de préparer l'extrait initial, le protocole précédent est appliqué en mettant 500 mg de poudre fine de feuilles et de fleurs en macération séparément dans 100 mL de méthanol (80%) et d'eau distillée à une température ambiante pendant 24 heures sous une agitation continue (WIS-10, Daihan Scientific Co. Ltd., Korea), suivi d'une filtration sur papier Whatman N°1 (0,55 mm). Les extraits obtenus sont codifiés (PM₀).

Les particules contenues dans les extraits initiaux (méthanoliques et aqueux) sont séparées par centrifugation différentielles suivant le protocole de Gopal et al. (2016), amélioré (centrifugation à 4 °C pour éviter l'oxydation des composés phénoliques). Une première centrifugation à $11929 \times g$ pendant 5 min est réalisée pour éliminer les microparticules des extraits initiaux, les nouveaux extraits obtenus sans microparticules sont codifiés (PM₁). Une partie des extraits PM₁ obtenus sont soumis à une centrifugation à $47718 \times g$ pendant 4 h pour éliminer les nanoparticules et les surnageants. Les extraits obtenus après centrifugation sont codifiés PM₂. Les six extraits PM₀, PM₁, PM₂ méthanoliques et aqueux sont conservés à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse.

4. Test d'enrichissement d'un modèle d'aliment solide

Afin de tester la possibilité de valorisation des molécules bioactives de *P. biloba* Desf. dans l'amélioration des propriétés antioxydantes des aliments, nous avons procédé à un enrichissement phénolique par l'extrait de la population récoltée de Sidi Amer d'un modèle d'aliment solide par le biais de la technique de déshydratation osmotique.

4.1. Préparation de la solution osmotique

Pour préparer la solution osmotique, 5g de poudre végétale est mise en macération dans 200 mL d'eau distillée à une température de 39 ± 1 °C pendant 24 heures sous agitation continue (WIS-10, Daihan Scientific Co. Ltd., Korea). Le macérât est conservé à 4 °C jusqu'au moment d'enrichissement.

4.2. Préparation de l'aliment modèle

Le modèle d'aliment solide est confectionné suivant le protocole de Rózek et al. (2007) avec de légères modifications. L'aliment modèle est un gel agar-agar 2% (p/p) préparé dans l'eau distillée et additionné de sucrose à une concentration de 5% (p/p). Le mélange est stérilisé dans un autoclave à 120 °C pendant 20 minutes puis coulé dans des petits moules afin d'obtenir des cubes à dimensions identiques (25 mm × 22 mm × 7 mm) et en poids ($3,66 \pm 0,06$ g). La gélification est effectuée à une température ambiante. Les cubes d'agar-agar obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à l'étape d'enrichissement.

4.3. Processus de déshydratation osmotique

L'enrichissement de l'aliment modèle est réalisé par le processus de déshydratation osmotique (DOS) dans l'extrait aqueux préparé préalablement. Le modèle d'aliment est immergé dans 200 mL de la solution osmotique pendant 4, 8, 12, et 24 h à 4°C et à l'abri de la lumière avec contrôle de pH avant et après l'enrichissement. À chaque intervalle de temps, 3 cubes sont retirés de la solution d'enrichissement, soigneusement épongés par papier hygiénique et écrasés afin d'obtenir une pâte homogène conservée par la suite à 4 °C jusqu'au moment d'extraction.

4.4. Préparation des extraits d'aliment modèle

Pour déterminer l'impact de l'imprégnation phénolique de l'aliment modèle dans l'extrait de *P. biloba* Desf., 2 g de chaque pâte obtenue précédemment à chaque intervalle de temps est extraite avec 20 mL d'eau distillée pendant 10 min avec agitation suivie de filtration sur papier filtre. Le résidu de la pâte est rincé trois fois afin d'épuiser la totalité de ses composés bioactifs. L'extrait obtenu sert à l'analyse de différents paramètres.

5. Screening phytochimique

Le screening phytochimique concerne les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes totaux dans tous les extraits préparés précédemment. Le dosage des flavonols est réalisé seulement sur les extraits exploités dans la révélation de la variation en biomolécules entre les feuilles et les fleurs de six populations.

5.1. Dosage des composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux (CPT) dans différents extraits de *P. biloba* Desf., est déterminée par la méthode du réactif Folin-Ciocalteu suivant le protocole décrit par Singleton et al. (1999). Une mixture est préparée par mélange d'un volume de 100 µL de l'extrait végétal (2 mg/mL) avec 100 µL de réactif Folin-Ciocalteu préparé à 10% dans l'eau distillée. Après 10 min d'incubation à une température ambiante, un volume de 300 µL de Na₂CO₃ (7,5%) est additionné au mélange puis ajusté à 1400 µL par l'eau distillée. La mixture est incubée à l'obscurité et à une température ambiante pendant 2 heures suivie de lecture d'absorbance à 765 nm par un spectrophotomètre Uv-Vis (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd.,

Korea) contre un tube blanc qui contient tout les réactifs à l'exception de l'extrait végétal (100 μL de méthanol au lieu de l'extrait). Le contenu phénolique est exprimé en microgramme équivalent d'acide gallique/milligramme (μg EAG/mg) en référence à la courbe d'étalonnage réalisée par une gamme de concentration d'acide gallique (Tableau 8).

Tableau 8. Préparation de la courbe d'étalonnage des composés phénoliques en acide gallique

Tube	Acidegallique 0,1mg/mL (μL)	Folin- Ciocalteu à 10% (μL)	Na_2CO_3 à 7.5% (μL)	Eau distillée (μL)	Acidegallique (μg)
Blanc	00	100	300	1000	00
1	100	100	300	900	10
2	200	100	300	800	20
3	300	100	300	700	30
4	400	100	300	600	40
5	500	100	300	500	50
6	600	100	300	400	60

5.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le taux des extraits en flavonoïdes totaux (FT) est évalué suivant la méthode colorimétrique décrite par Tepe et al. (2011) avec une légère modification. 1000 μL d'extrait (1 mg/mL) est mélangé avec 1000 μL d'une solution méthanolique de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) préparé à 2 %. Cette mixture est incubée à une température ambiante pendant 1 heure suivie d'une lecture d'absorbance de la couleur jaune par spectrophotomètre (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) à 420 nm. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en microgramme équivalent de Quercétine/milligramme (μg EQ/mg) en référant à la courbe d'étalonnage établi par une série de concentration du standard Quercétine (Tableau 9).

Tableau 9. Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes en quercétine.

Tube	Quercétine à 0,1mg/mL (μL)	AlCl_3 à 2% (μL)	Méthanol (μL)	Quercétine (μg)
Blanc	00	1000	1000	00
1	100	1000	900	10
2	200	1000	800	20
3	300	1000	700	30
4	400	1000	600	40
5	500	1000	500	50

5.3. Dosage des flavonols

L'estimation de la teneur en flavonols totaux contenus dans les extraits de *P. biloba* Desf. est réalisée suivant la méthode décrite par Jimoh et al. (2010). En bref, une mixture est préparée dans un tube contenant 200 μL de l'extrait préparé à 2 mg/mL, 500 μL de trichlorure d'aluminium (2%), 500 μL d'acétate de sodium (CH_3COONa) préparée à 5% et 300 μL de méthanol. La mixture est incubée à 20°C pendant 2 heures et demie, l'absorbance est lue par un spectrophotomètre (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) à 440 nm. La teneur en flavonols est exprimée en microgramme équivalent rutine/milligramme d'extrait brute ($\mu\text{g ER/mg}$) en utilisant la courbe d'étalonnage établie par une gamme de concentration de rutine (Tableau 10).

Tableau 10. Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonols en rutine.

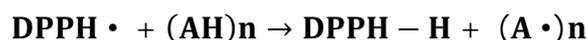
Tube	Rutine à 0,1 mg/mL (μL)	AlCl_3 à 2% (μL)	CH_3COONa à 5 % (μL)	Méthanol (μL)	Rutine (μg)
Blanc	00	500	500	500	00
1	100	500	500	400	10
2	200	500	500	300	20
3	300	500	500	200	30
4	400	500	500	100	40
5	500	500	500	00	50

6. Détermination des propriétés antioxydantes

L'activité antioxydante, des différents extraits de *P. biloba* Desf., est évaluée par deux tests complémentaires et universels: Le test anti radicalaire utilisant un composé chimique organique le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le test de blanchissement β -carotène / acide linoléique.

6.1. Test anti radicalaire(DPPH)

Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui donne une absorbance maximale à 540 nm. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (Brand-William et al., 1995). On peut résumer la réaction sous forme de l'équation suivante:



Le test DPPH est réalisé selon la méthode de Brand-William et al. (1995). Brièvement, 500 µL de chaque extrait à différentes concentrations est additionné à 1 mL de solution méthanolique de DPPH d'une concentration de 0,1 mM. La mixture est incubée pendant 30 min à une température ambiante et à l'obscurité. La décoloration du radical libre DPPH de violet vers le jaune est mesurée par spectrophotomètre UV-Vis (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) à 540 nm contre un blanc contenant le méthanol.

Le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé selon la formule suivante:

$$I\% = \left(\frac{A_0 - A_s}{A_0} \right) \times 100$$

Où :

As: Absorbance de l'échantillon;

A₀: Absorbance de DPPH sans extrait.

L'activité anti radicalaire est exprimée en IC₅₀. Cette valeur déduite de la courbe de régression logarithmique correspond à la concentration (µg d'extrait/mL de méthanol) qui inhibe 50% du radical libre DPPH alors que l'activité anti radicalaire de l'aliment modèle est exprimée en pourcentage d'inhibition (I%). Le pouvoir anti radicalaire des standards acide ascorbique, α- tocophérol et BHT, est déterminé suivant le même protocole.

6.2. Test de blanchissement β-carotène/acide linoléique

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont oxyder le β-carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur jaune,

cette décoloration peut être suivie par spectrométrie à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de β -carotène. La capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Dapkevicius et al., 1998).

Le test du β -carotène / acide linoléique est réalisé suivant la méthode décrite par Kelen et Bektas (2008) avec quelques modifications. En bref, une solution β -carotène / acide linoléique est préparée par dissolution de 0,5 mg de β -carotène dans 1 mL de chloroforme avec addition de 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de tween 40.

Après évaporation totale du chloroforme sous vide, 100 mL d'eau distillée est ajouté avec agitation vigoureuse. Un volume de 2,5 mL de cette mixture est additionné à 350 μ L de chaque extrait préparé à 2 mg/mL. Ce système d'émulsion est incubé pendant 2 heures à 50 °C et à l'obscurité. Le blanchissement de β -carotène est mesuré par spectrophotomètre UV-Vis (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) à 490 nm. La même procédure est répétée avec les antioxydants synthétiques: l'hydroxy-toluène-butylé (BHT), l'acide ascorbique et l' α -tocophérol.

L'activité antioxydante relative (AAR) est exprimée en pourcentage (%) suivant la formule suivante:

$$\mathbf{AAR(\%)} = (\mathbf{As} / \mathbf{Ac}) \times \mathbf{100}$$

Où

As: Absorbance de l'échantillon à 2 heures;

Ac: Absorbance du contrôle BHT à temps T_0 ;

Pour calculer AAR du standard BHT, L'absorbance de l'échantillon (As) de l'échantillon est remplacée par l'absorbance du BHT à 2 heures.

7. Analyses statistiques

Tous les tests sont effectués en triplicata et les valeurs seront présentées par moyenne \pm écart type. Les valeurs d'IC₅₀ sont calculées par la méthode de régression logarithmique à partir de la courbe [% inhibition =f (concentrations)]. Les résultats d'analyse des extraits sont soumis à ANOVA avec le Test de Tukey et la différence à $P \leq 0,05$ est considérée significative. Le coefficient de corrélation de Pearson est calculé entre les différents tests pour établir la relation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés bioactifs. Le logiciel servant à l'analyse statistique et la création des figures est SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 16.0 software pour Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Partie II: Matériel et Méthodes

Chapitre 4.

Étude de la diversité génétique

Chapitre 4. Étude de la diversité génétique

1. Matériel végétal

Le second volet traité lors de ce travail de thèse consiste à déterminer l'existence ou l'absence de polymorphisme génétique entre les six populations de *P. biloba* étudiées.

Le matériel végétal utilisé, pour conduire cette étude, est représenté par les mêmes populations de *P. biloba* récoltées de la région de Chlef et exploité dans le screening phytochimique (chapitre 3). Les feuilles fraîches, de chaque population, sont collectées pendant la période active de croissance de la plante (Avril 2017) et servent pour l'extraction d'ADN génomique.

2. Produits chimiques et réactifs

Les principaux produits chimiques et réactifs utilisés durant notre expérimentation sont de natures diverses: des amorces (Eurofins, Germany), des kits d'extraction d'ADN «Extract-N-Amp™ plant PCR kits» (Sigma-Aldrich, Germany), des marqueurs de taille de 50 à 800 pb, des solutions tampon de PCR (bleu/orange 6X), la Taq polymérase, Dntp mix, le $MgCl_2$ et le tampon de charge 5X (PROMEGA, USA).

3. Extraction de l'ADN génomique

Un fragment de tissu de jeunes feuilles, de 0.2 g, est prélevé de chaque échantillon. Il est d'abord trempé dans de l'eau de Javel puis rincé à l'eau distillée stérile et enfin écrasé dans un mortier autoclavé préalablement. L'extraction proprement dite est réalisée à l'aide d'un kit d'extraction commercial «Extract-N-Amp™ plant PCR kits» en suivant scrupuleusement les différentes étapes décrites dans la notice d'emploi. Une fois l'extraction est réalisée, les extraits d'ADN misés dans des microtubes sont conservés au réfrigérateur (4 °C) jusqu'à leur utilisation (Figure 10).

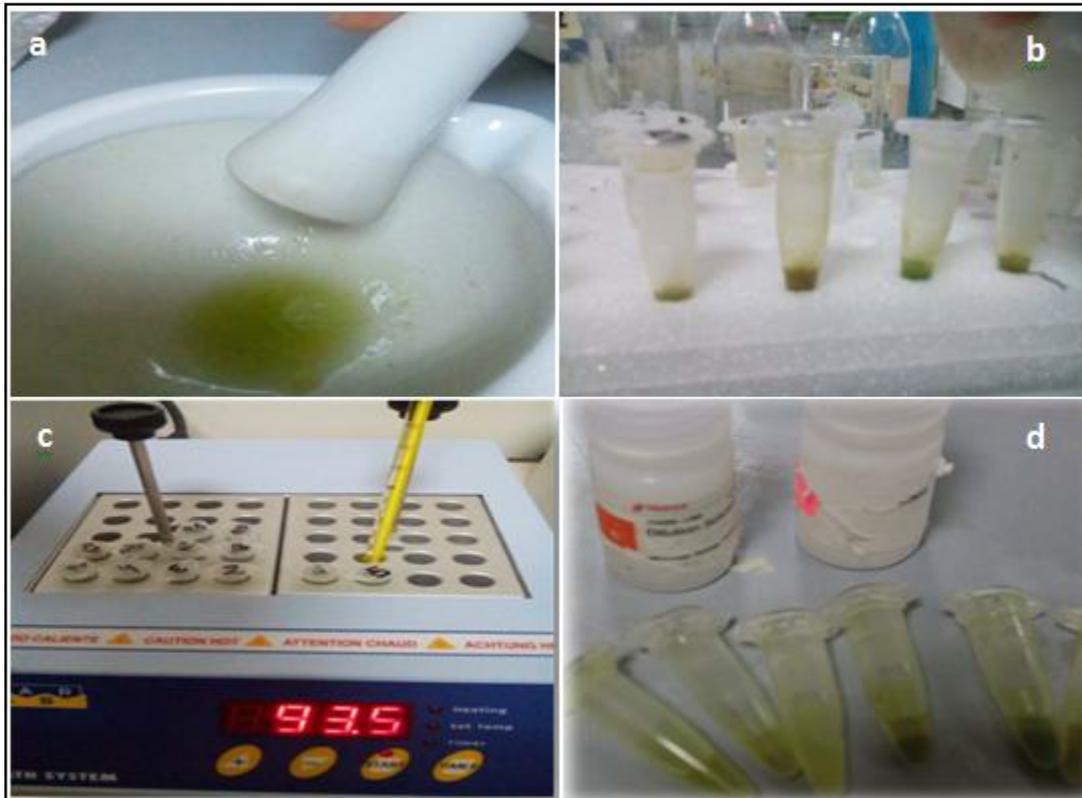


Figure 10: Extraction d'ADN génomique de six populations. a) broyage du matériel végétal dans un mortier; b) Ajout de la solution de dilution; c) Incubation dans un hot bloc à $95\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min; d) refroidissement à une température ambiante.

4. Dosage de l'ADN

Pour évaluer la quantité et la qualité d'ADN extrait de différents échantillons, nous avons procédé à un dosage spectrophotométrique et une vérification sur gel d'agarose.

4.1. Spectrophotométrie UV-Vis

La détermination de la concentration d'ADN extrait permet d'effectuer des dilutions afin de mettre la concentration d'ADN en solution dans la gamme de concentration optimale pour la PCR.

La concentration d'ADN extrait, des six populations, est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Spectrophotometer model 4251/50, Zuzi, Spain). Pour cela, une dilution d'ADN préparée dans l'eau distillée est mise dans une cuve stérilisée au préalable pour lecture de densité optique (DO) à 260 nm. La concentration de l'ADN est évaluée sur la

base qu'une unité de DO correspond à une solution d'ADN bi-caténaire de 50 µg/mL (Sambrook et al., 2001) suivant la formule suivante:

$$\text{Quantité d'ADN (ng/}\mu\text{L)} = \text{absorbance à 260 nm} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$$

Pour vérifier la qualité de l'ADN, la DO est prise à 260 et 280 nm pour un même échantillon. Le rapport des DO 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2. Si ce rapport est inférieur à 1,8 cela indique une contamination de l'échantillon par les protéines alors qu'une valeur supérieure à 2 signifie l'existence des composés phénoliques dans la solution examinée.

4.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Une vérification visuelle de l'ADN extrait est effectuée via une migration sur gel d'agarose à 1,2 %, additionné de bromure d'éthidium (BET) baignant dans du tampon TBE (Annexe). Pour cela, 6 µL de la solution d'ADN sont mélangés sur parafilm à 1 µL de tampon de charge bleu/orange 6X puis migré sous une tension de 80 V et visualisé sous une lumière UV dans un trans-illuminateur afin de juger si l'extraction est satisfaisante en fonction de l'intensité des bandes.



Figure 11: Vérification de la qualité des d'ADN extraits par Electrophorèse sur gel d'agarose.

5. Amplification d'ADN

5.1. Les amorces ISSR

Les amorces ISSR utilisées lors de cette expérience sont en nombre de 22 amorces (Tableau 11) de type UBC (désignées de University of British Columbia) synthétisées par la compagnie Allemande (EUROFINS). Le choix des amorces est basé sur les travaux précédents montrant une reproductibilité sur des espèces de genre *Phlomis* (Evren et al., 2015) et *Salvia* (Peng et al., 2014).

Tableau 11. Séquence et température d'hybridation des amorces ISSR utilisées.

Code de l'amorce	Séquence (5'→3')	Température d'hybridation (°C)
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50,4
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50,4
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52,8
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50,4
UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTT	50,4
UBC818	CACACACACACACACAG	52,8
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	52,8
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	52,8
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52,5
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52,5
UBC846	CACACACACACACACART	52,5
UBC855	ACACACACACACACACYT	52,5

Y= C ou T

R= G ou A

5.2. L'amplification PCR

Le mélange réactionnel pour la réaction PCR est constitué d'un volume total de 25 µL comportant : 2,5 µL de tampon PCR 10X, MgCl₂ (2 mM), dNTPs (200 µM), amorce ISSR (0,8 µM), 0,5 U de Taq polymérase et environ 15 à 20 ng d'ADN à amplifier. L'amplification PCR s'est faite dans un thermocycleur (INFINIGEN) suivant le protocole adapté de Peng et al. (2014) (Figure 12) incluant le programme thermique suivant:

- 10 min de dénaturation à 94°C ;

- 40 cycles de trois étapes: 30 s de dénaturation à 94 °C, 1 min d'hybridation à la température spécifique à l'amorce et 1 min d'extension à 72 °C;

-10 min d'extension finale à 72 °C.

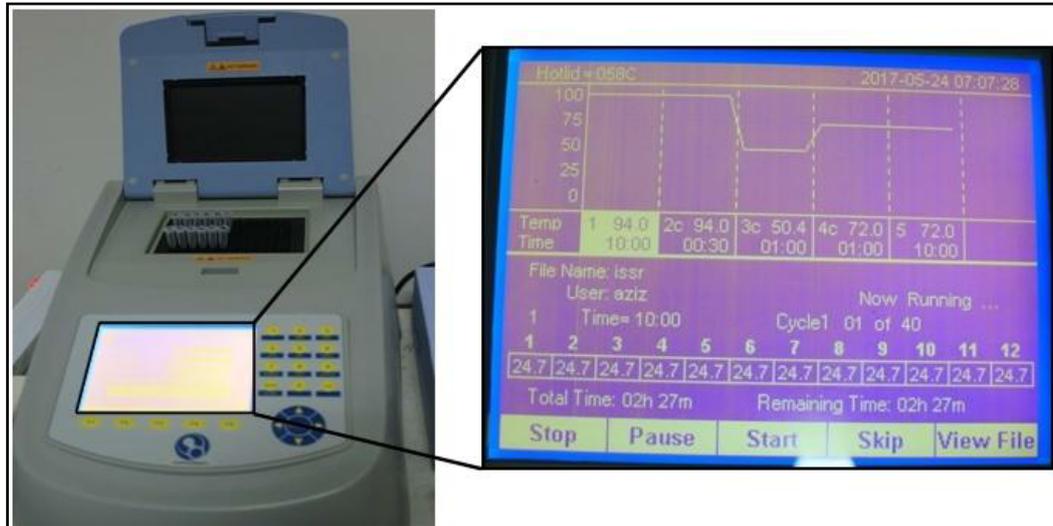


Figure 12: Thermocycleur (à gauche) et programme PCR (à droite) utilisé pour l'amplification ISSR-PCR.

6. Séparation de l'ADN amplifié (Electrophorèse sur gel d'agarose)

6.1. Préparation du gel

Les produits amplifiés migrent par électrophorèse sur gel d'agarose. La préparation du gel se fait d'abord par dissolution de 0,8 g d'agarose dans 100 mL du tampon TBE 0,5X (Annexe). L'agarose est fondu au four micro-ondes puis refroidie jusqu'à environ 60°C. On additionne à la solution d'agarose 10 µL de bromure d'éthidium (BET concentré à 0,5 µg/mL) puis on fait couler le mélange dans un porte gel où un peigne est soigneusement placé pour créer les puits (Figure 13). Après polymérisation complète, le peigne est enlevé.

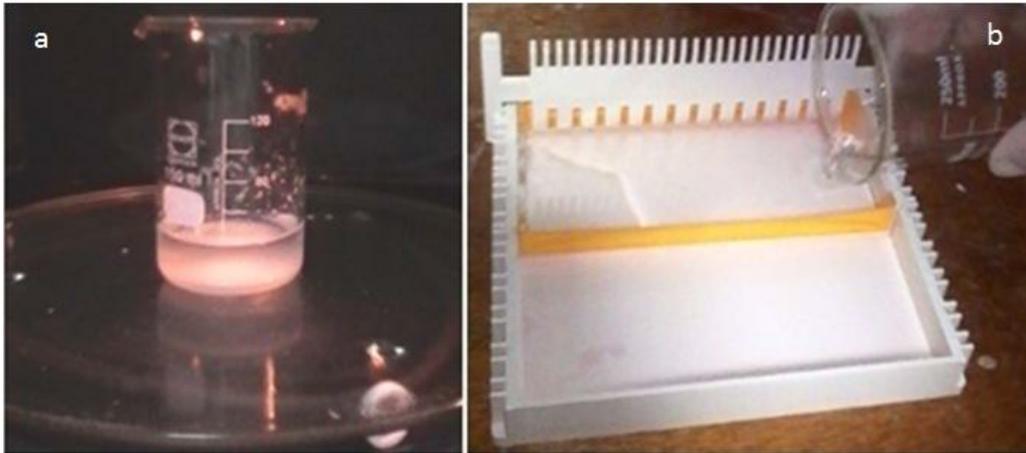


Figure 13: Préparation du gel d'agarose par (a) dissolution au four micro-onde et (b) coulage dans un porte gel.

6.2. Migration et visualisation des amplifias

L'amplification est vérifiée par électrophorèse: un volume de 5 μL de la solution obtenue après PCR est mélangé sur parafilm à 1 μL de tampon de charge bleu-orange 5X, puis migré sur gel d'agarose 0,8% baignant dans du tampon TBE 0,5X (Annexe). Le marqueur de taille utilisé est un "50 bp DNA Ladder PCR", dont 5 μL de marqueur de taille mélangé à 1 μL de tampon de charge bleu-orange 5X sont déposés dans les deux puits d'extrémité afin d'estimer la taille des bandes produites. Après une migration de 1h à 1h30 sous 100 V, le gel est déposé sur une plaque d'un transilluminateur UV pour révéler les fragments d'ADN amplifiés avec prise d'une photographie à l'aide d'un appareil photo (CANON).

7. Analyse de données ISSR

Les bandes de chaque profil sont désignées par leur présence (1) ou absence (0) pour construire une matrice de données binaires. La matrice a ensuite été utilisée pour déduire le nombre de loci effectifs, le pourcentage de loci polymorphes et monomorphe et le nombre des bandes pour chaque amorce ISSR.

Pour examiner en détail la diversité génétique entre les six populations, la matrice de données binaires est soumise à une analyse par le logiciel PAST afin d'obtenir un dendrogramme phylogénique (cluster) suivant l'indice de similarité Jaccard avec la méthode UPGMA (méthode de groupe de paires non pondérée avec la moyenne arithmétique).

Partie III: Résultats et discussion

Partie III: Résultats et discussion

Chapitre 5.

Screening phytochimique & activité antioxydante

Chapitre 5: Screening phytochimique et activité antioxydante

Dans ce chapitre, nous présentons successivement les résultats, relatifs à l'étude phytochimique (screening ou criblage phytochimique), réalisée sur des extraits de feuilles et de fleurs, de six populations de l'espèce *P. biloba*, puis ceux liés à l'étude de l'activité antioxydante des extraits. Le screening phytochimique, effectuée pour la première fois sur l'espèce *P. biloba* Algérienne, s'est basé essentiellement sur la détermination des teneurs en composés phénoliques totaux (CPT), en flavonoïdes totaux ainsi qu'en flavonols. Quant à l'activité antioxydante des extraits de feuilles et des fleurs, elle est évaluée par deux méthodes universelles et complémentaires: le test du radical libre DPPH et le test de blanchissement du β -carotène/acide linoléique.

1. Screening phytochimique

1.1. Rendement en extrait brut

Les rendements en extrait brut ont été évalués après macération de poudre des parties aériennes (feuilles et fleurs) de six populations de *P. biloba* dans la solution hydro-méthanolique. Les résultats de la Figure 14 montrent que les rendements varient à la fois en fonction de l'organe végétal utilisé et aussi en fonction de la population étudiée. En effet, avec les feuilles, les rendements oscillent entre 20,82 et 26,58 % (p/p) (poids de l'extrait/poids de matériel végétal mise en macération) respectivement avec les populations AHS et OAK. Quant aux fleurs, leurs rendements varient entre 22,20 et 30,08 % (p/p) respectivement avec les populations SAM et TAW (Figure14).

Les rendements obtenus avec *P. biloba*, malgré leurs différences, ils ne présentent, selon les résultats de l'analyse statistique ($p < 0,05$), aucune variation significative entre les populations étudiées. Même constat concernant les différences de rendements par organe puisqu'aucune partie (feuilles ou fleurs) n'a montré une supériorité absolue chez toutes les populations. Avec les populations (AHS, TAW et MEJ) les rendements sont meilleurs avec les fleurs alors qu'avec les populations (SAM, ENK et OAK), ce sont plutôt les feuilles qui se montrent plus rentables.

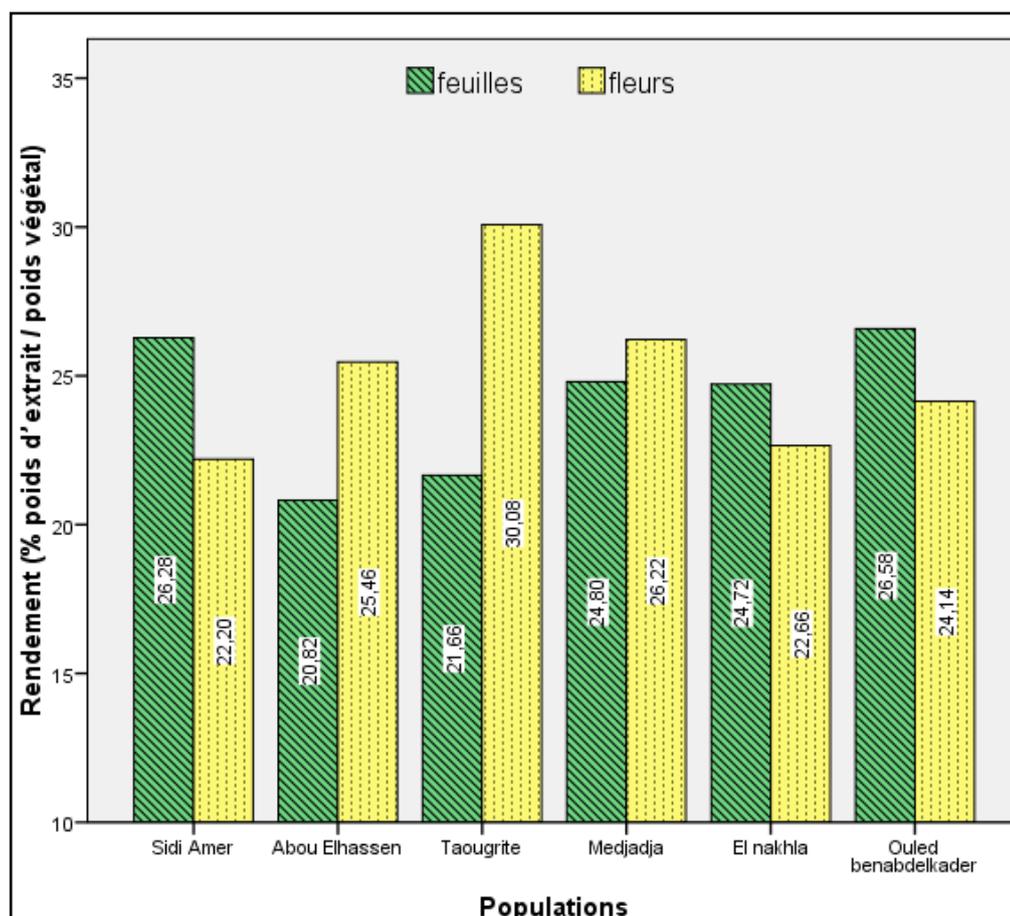


Figure 14: Rendements des populations de *P. biloba* en extrait brut.

Les rendements en extraits bruts obtenus, lors de cette étude, que ce soit avec les feuilles ou les fleurs, sont de loin élevés par rapport à ceux rapportés par la bibliographie. En effet, certains auteurs avancent des rendements de l'ordre de 8,12% (Limem-Ben Amor et al., 2009b) et de 9,1 % (Dellai et al., 2009), obtenus respectivement à partir de feuilles et de fleurs de *P. biloba*.

Selon la bibliographie, l'écart différentiel entre les rendements est souvent attribué à la nature des solvants ayant servi à l'extraction. La solution hydro-méthanolique représente généralement la mixture la plus commode dans l'extraction à partir des plantes. La bonne performance de cette solution est justifiée par la combinaison des propriétés de méthanol et de l'eau dans la solubilisation des composés bioactifs contenus dans le matériel végétal (Do et al., 2014).

En plus de l'effet solvant, les rendements en extrait bruts, au sein d'une même espèce, peuvent être impactés par la nature des organes végétaux analysés et l'origine géographique des plantes récoltées (Rodolfo et al., 2006).

1.2. Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT)

Les résultats de l'évaluation des teneurs en CPT dans les extraits de feuilles et de fleurs des six populations de *P. biloba*, sont présentés dans la Figure 15. Nous constatons que les teneurs en CPT varient à la fois selon les populations étudiées et pour une même population, selon la nature de l'organe analysé. En effet, s'agissant des populations, nous relevons que les teneurs oscillent entre $78,22 \pm 1,12$ (TAW) et $153,46 \pm 1,36$ μg EAG/mg d'extrait (AHS) de feuilles alors qu'elles varient entre $59,99 \pm 1,62$ (ENK) à $90,67 \pm 2,42$ μg EAG/mg d'extrait (SAM) de fleurs. Souvent, ce sont les feuilles qui paraissent mieux pourvues en CPT que les fleurs. Les populations (extraits de feuilles) montrent des différences significatives ($p < 0,05$) entre elles et peuvent être classées dans l'ordre décroissant suivant: AHS < OAK < MEJ < ENK < SAM < TAW. Avec des populations comme SAM et TAW, les teneurs en CPT des extraits de feuilles et de fleurs ne présentent pas de différence significative ($p < 0,05$).

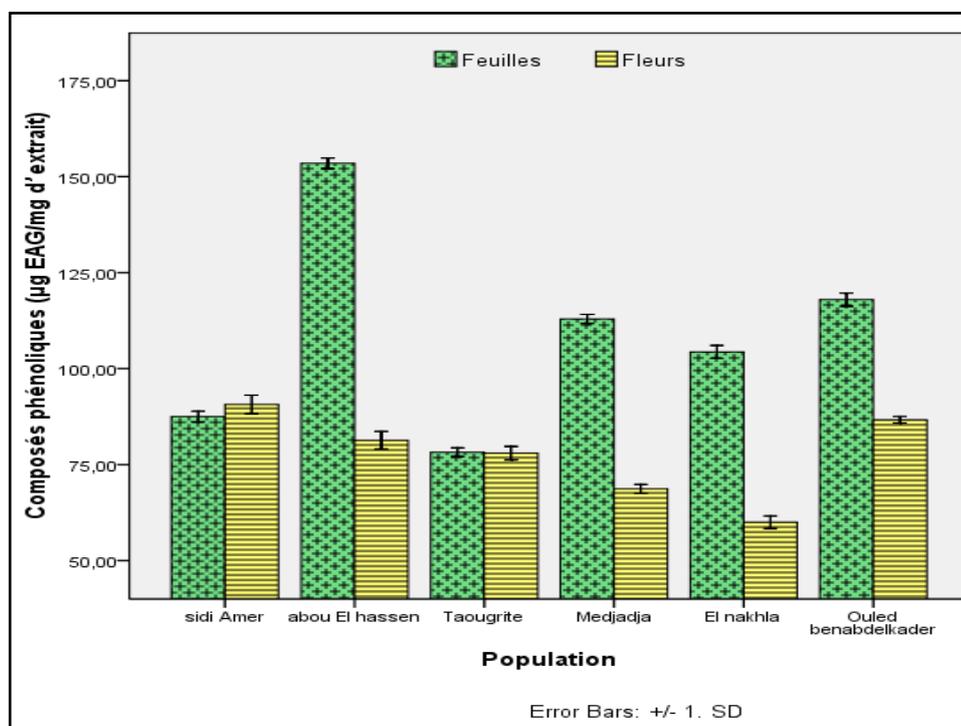


Figure 15: Teneur phénolique des populations de *P. biloba*.

D'après nos investigations bibliographiques, il n'existe aucune publication scientifique ayant porté sur l'analyse des composés phénoliques chez l'espèce *P. biloba*. Les résultats de notre étude sont les premiers à être publiés sur le sujet. Nous ne pouvons malheureusement pas confronter nos résultats à d'autres, obtenus avec la même espèce *P. biloba*.

De manière générale, les variations des teneurs en CPT, comme les autres groupes chimiques d'ailleurs, dans les extraits végétaux, sont influencées par de nombreux facteurs tels: le génotype, la nature et l'âge des organes analysés, la saison de récolte des échantillons, l'environnement, etc.

D'après nos résultats, c'est principalement le facteur génotypique et la nature des organes des extraits analysés qui semblent impacter fortement les rendements en CPT.

Le premier facteur, ne s'exprime pas seulement entre les individus d'une même population ou entre les populations d'une même espèce mais va au delà (Erbano et al., 2015). En effet, la comparaison de nos résultats avec d'autres espèces du genre *Phlomis*, montre que l'espèce *P. biloba* est plus riche en CPT. À titre comparatif, la teneur phénolique enregistrée dans les six populations surpasse énormément celles annoncées pour *P. armeniaca* (Sarikurkcü et al., 2015), *P. nissolii* et *P. pungens* var. *pungens* (Sarikurkcü et al., 2014).

L'influence génotypique mais aussi environnementale sur le rendement en CPT a été signalée par de nombreux auteurs sur des espèces autres que les *Phlomis*. Selon Ben Ferhat et al. (2013), la teneur phénolique de dix populations de *Salvia verbenaca* collecté de différentes régions en Tunisie a montré une variation remarquable allant de 55,03 à 136,33 µg GAE/mg de MS. Dans une autre étude réalisée par Bajalan et al. (2016), sur une trentaine de populations de lavandin (*Lavandula × intermedia*), le contenu phénolique oscillait entre 31,45 et 105,39 µg GAE/100 mg de MS, avec une différence significative entre les populations testées. Sur des travaux de recherche conduits sur 13 cultivars de fraise, Gündüz et Özdemir (2014) rapportent que les teneurs en CPT varient de manière significative d'un cultivar à un autre.

La variation de la teneur en CPT des populations d'une même espèce est attribuée généralement à la variation des conditions climatiques, à l'origine géographique et aux

conditions de croissance de chaque population (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013; Lamien-Meda et al., 2010). Ces facteurs environnementaux (qualifiés de facteurs épigénétiques) influencent fortement l'expression des gènes et conduisent, par voie de conséquence, à des réponses différentes. La variation génétique influence aussi l'accumulation des composés phénoliques dans la plante par la synthèse des quantités et/ou des types différents de ces composés phénoliques (Shahidi et Naczk, 1995).

Outre le facteur génotypique, la nature de l'organe influence aussi, à son tour, les teneurs en CPT des extraits. Les feuilles comptent parmi les organes riches en CPT, d'après les conclusions de nombreuses études conduites sur diverses plantes médicinales (Das et al., 2013; Stankovic et al., 2014). Ce qui confirme que les feuilles est le lieu de biosynthèse et d'accumulation principale des substances bioactives végétales.

Du point de vue qualitatif, les CPT produits par les espèces du genre *Phlomis* sont caractérisées habituellement par la dominance des acides phénoliques dans leur mixture chimique, notamment l'acide chlorogénique, l'acide benzoïque et l'acide rosmarinique qui constituent les composants dominants et/ou communs chez une bonne majorité des espèces *Phlomis* analysées (Sarikurkcu et al., 2015; Sarikurkcu et al., 2014; Zhang et Wang, 2009).

Les composés phénoliques jouent un rôle crucial dans les propriétés médicinales des plantes. Les applications thérapeutiques des plantes médicinales, riches en polyphénols, sont attribuées à ces molécules bioactives qui constituent un moyen efficace dans la lutte contre les maladies liées au stress oxydatif (Zhang et Wang, 2009). En plus de leurs intérêts thérapeutiques, les composés phénoliques prennent aussi une importance particulière dans l'industrie alimentaire par leurs potentiels retardant la dégradation oxydative et améliorant la qualité et la valeur nutritionnelles des aliments (Aneta et al., 2007; Paredes-Lopez et al., 2010)).

1. 3. Teneurs en flavonoïdes totaux (FT)

Les dosages des FT dans les extraits de *P. biloba* ont montré que les feuilles sont plus riches que les fleurs ($p < 0,05$) (Figure 16) et cela quelle que soit la population étudiée. Ce sont les feuilles de la population AHS qui enregistrent les meilleurs taux de FT ($53,84 \pm 0,24$

$\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait). Avec les extraits de fleurs, c'est la population MEJ qui a donné la meilleure valeur en FT ($15,85 \pm 0,40 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

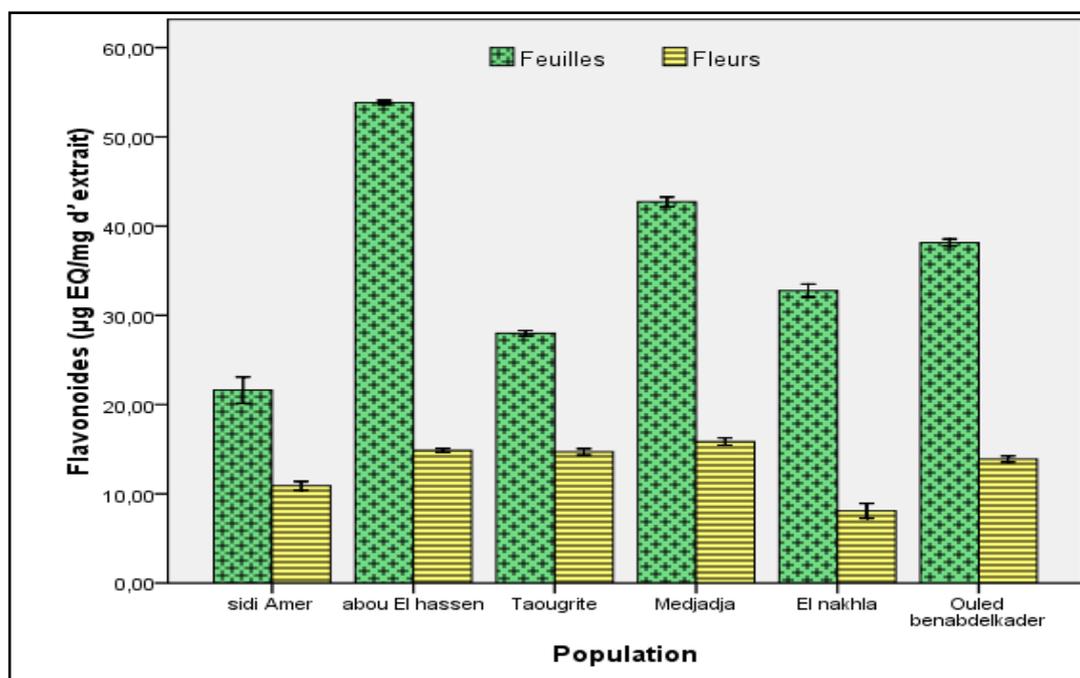


Figure 16: Teneur en flavonoïdes totaux des populations de *P. biloba*.

La distribution des flavonoïdes dans les plantes indique généralement leur abondance dans les feuilles comparativement aux autres parties de la plante. De nombreuses études confirment cela. Le screening de ces métabolites dans les parties de *Swertia bimaculata* (Hook & Thomas) a dévoilé la richesse en FT dans les extraits de feuilles par rapport à d'autres organes (tiges et aux racines) (Das et al., 2013). Aussi, selon une étude conduite par Stankovic et al. (2014), sur *Cornus mas* L. les feuilles renferment les taux les plus élevés en flavonoïdes que les fleurs et le fruit.

L'analyse statistique a révélé l'existence d'une variation significative ($p < 0,05$) en termes de richesse en flavonoïdes des extraits de feuilles, entre toutes les populations étudiées. Ces dernières sont classées par ordre d'importance (richesse en FT par ordre décroissant) comme suit: AHS > MEJ > OAK > ENK > TAW > SAM. Avec les fleurs, les populations sont classées en quatre groupes ($p < 0,05$). Le premier, le plus riche, regroupe les populations MEJ, AHS et TAW, le deuxième, renferme les populations AHS, TAW et OAK. La population SAM et ENK occupent respectivement la troisième et quatrième classe.

La variation des teneurs en FT en fonction des populations n'est pas spécifique au genre *Phlomis*. En effet, les résultats du screening réalisé sur une trentaine de populations de lavandin (*Lavandula × intermedia*) par Bajalan et al. (2016) a montré que le contenu en FT baigne dans un intervalle oscillant entre 28,19 et 71,62 µg EQ/100mg MS.

D'après nos recherches bibliographiques, le présent travail est la première contribution visant l'évaluation des FT dans les extraits de *P. biloba*. Les études conduites précédemment sur cette espèce par Limem-Ben Amor et al. (2009b) et Dellai et al. (2009) ont mis en évidence la présence des flavonoïdes dans les feuilles et les fleurs sans verser dans la quantification. D'autres travaux, comme ceux conduits par Kabouche et al. (2005), ont permis d'isoler trois flavonoïdes à partir de cette *Phlomis* qu'ils s'agissent de lutéoline, lutéoline 7-β-D-glucopyranoside et chrysoeriole 7-(3''-p-E-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside.

D'après la littérature, les espèces appartenant au genre *Phlomis* constituent un groupe de plantes très riche en flavonoïdes totaux. Les recherches entreprises sur de nombreuses espèces affiliées à ce genre confirment cela. Nous citerons, à titre d'exemple, les travaux menés sur *P. armeniaca*; *P. nissolii*; *P. pungens*, par Sarikurkcu et al. (2014) et (2015) qui démontrent tous, l'abondance des flavonoïdes chez ses espèces. Nos résultats concordent avec ces rapports indiquant la richesse des espèces du genre *Phlomis* en flavonoïdes.

Les constituants majoritaires en flavonoïdes caractérisant les espèces du genre *Phlomis* sont généralement représentés par: l'apigénine glycosylé, lutéoline, naringénine, eriodictyole et chryseriole (Kabouche et al., 2005; Kabouche et al., 2004; Li et al., 2010; Sarikurkcu et al., 2015; Sarikurkcu et al., 2014; Zhang et Wang, 2009). Les activités de ces biomolécules sont prouvées et élucidées dans de nombreuses études (Lin et Weng, 2006; Vermerris et Nicholson, 2008).

Les sous classes les plus importantes des flavonoïdes sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. L'ensemble de ces composés est caractérisé par une large gamme d'activités biologiques bénéfiques pour la santé humaine (Lin et Weng, 2006). Le naringénine commun dans la majorités des espèces *Phlomis* est prouvé par son effet anticancéreux (So et al., 1996), la leutéoline est connue par son action antioxydante puissante (Dwyer 1995). Les effets bénéfiques de différents

flavonoïdes bien que leurs teneurs dans plusieurs fruits, légumes et aliments sont répertoriés dans une base de données préparée par le département des Etats Unis pour l'agriculture, service de recherche agricole (US Department of Agriculture, Agricultural Research Service) (USDA, 2004).

La teneur en composés bioactifs dans les plantes est soumise à la régulation des voies biosynthétiques contrôlées par les gènes régulateurs codant les facteurs de transcription et les répresseurs résultant d'une amélioration ou d'une inhibition de l'expression de gènes structuraux influencés à leurs tours par les conditions internes (liées à la plante) et/ou externes (liées à l'environnement) (Vermerris et Nicholson, 2008).

1. 4. Teneurs en flavonols

Les résultats des analyses montrent que les teneurs en flavonols varient en fonction des populations et pour une même population, elles varient selon la nature des organes analysés (Figure 17). Les teneurs obtenus dans les extraits de feuilles par population suivent l'ordre décroissant suivant: OAK = ENK > AHS = MEJ = SAM = TAW. Avec les extraits de fleurs, les populations sont classées en quatre groupes, le premier inclut la population AHS suivi de TAW et SAM en deuxième groupe, le troisième groupe comporte SAM et OAK et le dernier MEJ + ENK.

Le contenu en flavonols des populations testées varie de $7,05 \pm 0,57$ à $11,13 \pm 0,25$ $\mu\text{g ER/mg}$ (avec les extraits de feuilles) et de $4,93 \pm 0,47$ $\mu\text{g ER/mg}$ et $12,71 \pm 0,50$ $\mu\text{g ER/mg}$ (avec les extraits de fleurs). Nos résultats avec *P. biloba* sont relativement supérieurs à ceux rapportés par Sarikurkcu et al. (2015) sur *P. armeniaca* ($3,58 \pm 0,19$; $1,20 \pm 0,05$ et $0,23 \pm 0,04$ avec les extraits d'acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux respectivement). Aussi, les résultats d'une autre conduite par Sarikurkcu et al. (2014), sur *P. nissolii* et *P. pungens* var. *pungens* a permis d'obtenir des teneurs de $2,88 \pm 0,06$ et $3,49 \pm 0,06$ $\mu\text{g d'équivalent Catéchine/mg d'extrait}$, respectivement.

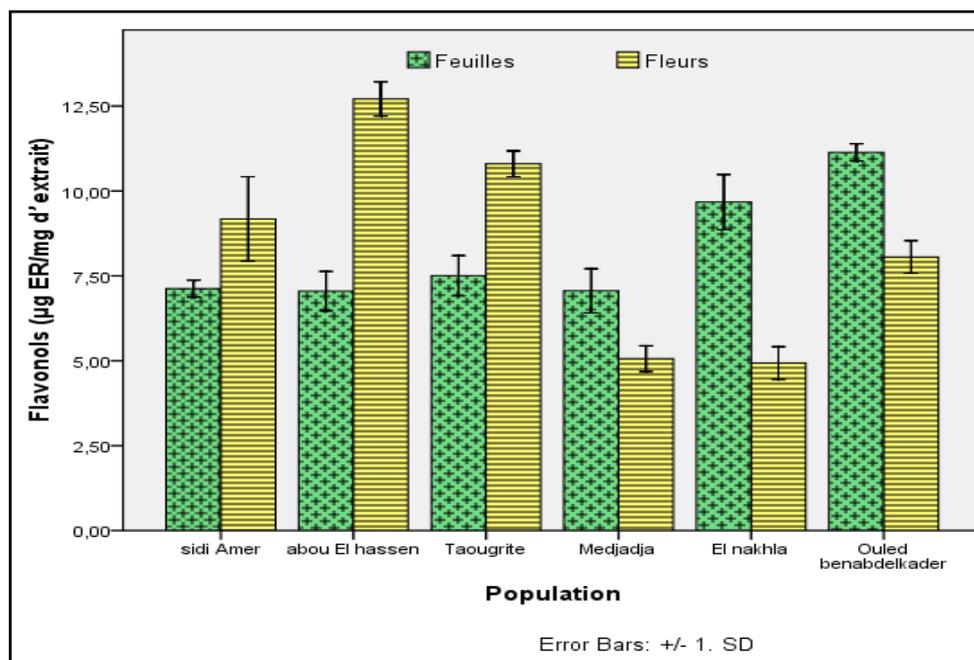


Figure 17: Teneur en flavonols des populations de *P. biloba*.

Les variations des teneurs en flavonols dépendent de plusieurs facteurs (génotypique, nature des organes analysés, l'environnement, saison de récolte des organes à analyser, etc.) (Crozier et al., 1997). Les flavonols sont sélectionnées parmi les autres groupes de flavonoïdes puisqu'elles représentent la catégorie des flavonoïdes la plus répandue dans le règne Planta, à l'exception des algues (Rausher, 2006). Ces biomolécules sont impliquées dans plusieurs processus importants pour la plante tels que la pigmentation (Forkmann, 1991), la protection contre l'irradiation UV (Ryan, 2001) et l'amélioration de la fertilité mâle en facilitant la germination pollinique (Taylor et Grotewold, 2005).

2. L'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des extraits végétaux est influencé par plusieurs facteurs ce qui nécessite l'adoption de plusieurs tests d'évaluation afin de prendre en considération les différents mécanismes d'action impliqués dans cette activité biologique. L'ensemble de ces techniques expérimentales reposent sur la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) qui comprennent les radicaux libres ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , HO_2^{\bullet} et RO^{\bullet}) et les formes non-radicales (H_2O_2 et $1O_2$) (Singh et al., 2010).

Lors de cette étude, l'estimation de l'activité antioxydante des feuilles et des fleurs des populations de *P. biloba* a été faite par deux méthodes universelles et complémentaires: le test du radical libre DPPH et l'essai de blanchissement β -carotène/acide linoléique. Les résultats des deux tests sont présentés dans les Figures 18 et 19 respectivement.

2.1. L'effet anti-radicalaire DPPH

Les résultats relatifs aux potentialités anti-radicalaires des populations étudiées et des standards examinés sont présentés dans la Figure 18. Nous constatons que toutes les populations sont dotées de pouvoir anti-radicalaire DPPH qui semble varier selon les populations et aussi, pour une même population, selon les organes testés (feuilles et fleurs). Avec les extraits de feuilles, c'est la population AHS qui montre les bonnes capacités anti-radicalaires suivie des populations OAK, MEJ, ENK, TAW et SAM respectivement ($p < 0,05$). Que ce soit avec les extraits de feuilles ou de fleurs, c'est toujours la population AHS qui présente les meilleures potentialités anti-radicalaires.

Pour ce qui est de l'effet de la nature des organes végétaux, ce sont les extraits de feuilles qui donnent les meilleures réponses. Les valeurs d' IC_{50} des extraits de feuilles étaient de $47,78 \pm 1,11$ à $132,97 \pm 2,16$ μg d'extrait/mL alors que celles des fleurs varient entre $87,25 \pm 1,56$ et $232,74 \pm 1,44$ μg d'extrait/mL. Le pouvoir anti-radicalaire DPPH des feuilles était supérieur à celui des fleurs dans la majorité des populations à l'exception de la population SAM où les extraits de fleurs étaient meilleurs ($p < 0,05$). Nous relevons aussi d'après les résultats (Figure 18) qu'aucun extrait n'a montré un effet supérieur à celui des standards acide ascorbique ($3,82 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$); alpha-tocophérol ($7,43 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$) et BHT ($17,95 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$) à $p < 0,05$. L'effet anti-radicalaire décelé, lors de cette étude, chez les populations de *P. biloba* n'a fait l'objet d'aucune étude, selon nos recherches bibliographiques.

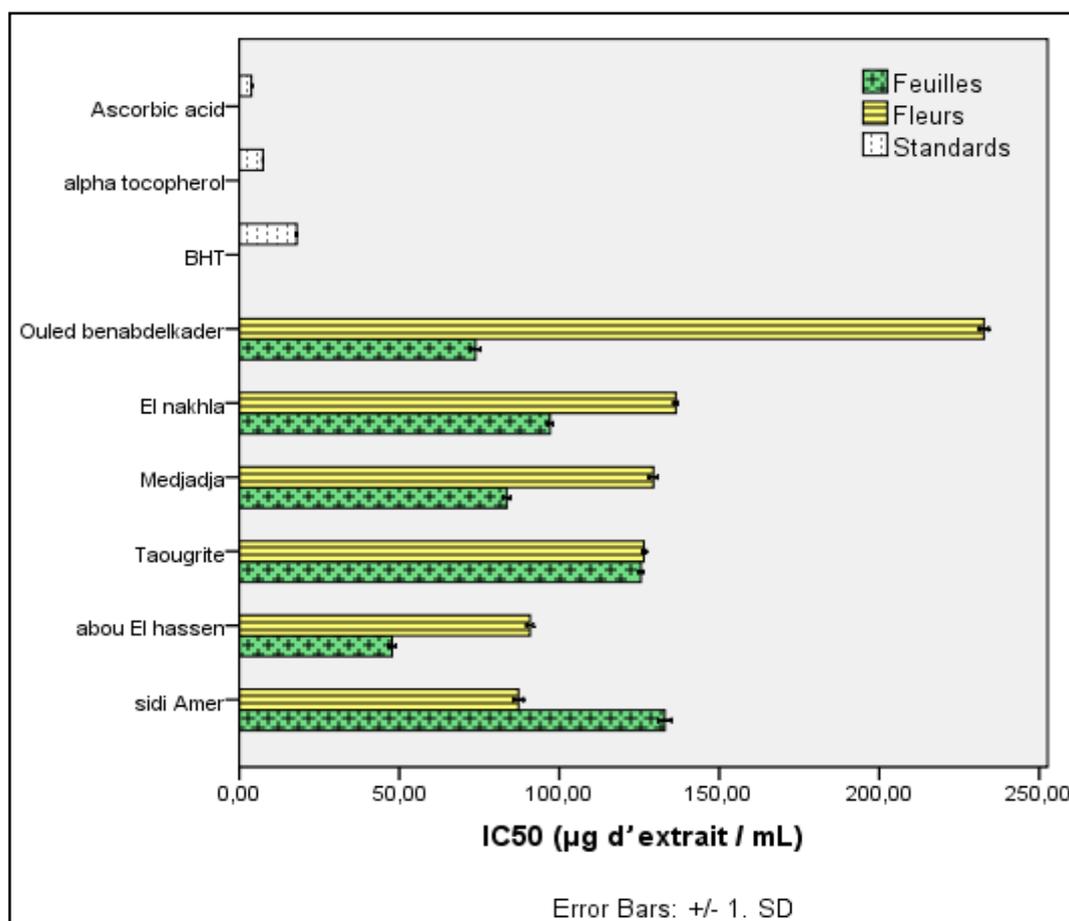


Figure 18: Pouvoir anti-DPPH des populations de *P. biloba* et des standards.

Il n'y a pas que l'espèce *P. biloba*, dans le genre *Phlomis*, qui présente des aptitudes anti-radicalaires. C'est le cas par exemple des espèces *P. nissolii* et *P. pungens* var. *pungens*. Dans une étude, réalisée par Sarikurkcü et al., (2014), l'espèce *P. nissolii* a donné des résultats très intéressants puisque les IC_{50} des extraits étaient presque similaires à ceux des standards synthétiques. En effet, les IC_{50} obtenus ont atteint les $1,14 \pm 0,01$; $1,77 \pm 0,07$ et $2,88 \pm 0,21$ mg d'extrait/mL par l'extrait aqueux, méthanolique et acétate d'éthyle respectivement. Selon le même auteur, l'espèce *P. pungens* var. *pungens* a montré aussi de bonnes aptitude anti-DPPH avec un IC_{50} de $1,17 \pm 0,02$ mg d'extrait/mL (extrait aqueux) et $2,28 \pm 0,13$ mg d'extrait/mL (extrait méthanolique).

Une autre espèce (*P. armeniaca*) de *Phlomis* présente aussi des potentialités anti-radicalaires se rapprochant de celles de *P. biloba*. En effet, d'après Sarikurkcü et al., (2015), les extraits des parties aériennes de *P. armeniaca* ont permis d'obtenir des IC_{50} de $125,23 \pm 1,08$ mg d'équivalents Trolox/g extrait (avec l'extrait aqueux), $67,48 \pm 3,85$ mg d'équivalents

Trolox/g extrait (avec l'extrait méthanolique) et $35,98 \pm 1,27$ d'équivalents Trolox/g extrait (avec l'extrait acétate d'éthyle) par le test DPPH.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'efficacité des extraits de certaines espèces de *Phlomis*, en termes d'activité anti-radicalaire, peut rivaliser avec les antioxydants synthétiques. Il serait donc souhaitable d'envisager l'emploi de ses extraits naturels en tant que conservateur (additif alimentaire), surtout que les antioxydants synthétiques sont suspectés par leurs possibles effets toxiques notamment cancérigène contrairement aux additifs naturels (Venskutonis et al., 2004).

2.2. Le pouvoir d'inhibition de blanchissement du β -carotène

Les résultats du test de blanchissement du β -carotène par les extraits de *P. biloba* et les standards sont représentés dans la Figure 19. Les résultats montrent l'existence, chez l'ensemble des populations de *P. biloba* testées, de bons pouvoirs d'inhibition de blanchissement du β -carotène. La population AHS a enregistré le meilleur taux d'inhibition ($76,18 \pm 0,98\%$) avec les extraits de feuilles. Par contre ce sont plutôt les populations TAW ($70,47 \pm 0,48\%$), ENK ($70,42 \pm 0,85\%$) et MEJ ($68,58 \pm 0,58\%$) qui répondent le mieux avec les fleurs ($p < 0,05$). Avec ces résultats nous pouvons conclure que le pouvoir antioxydant semble être plus puissant chez les populations (AHS, OAK et SAM) lorsqu'il s'agit de feuilles. Avec les fleurs par contre ce sont les populations TAW et MEJ qui paraissent plus performants. On note cependant que malgré les bonnes performances des certains extraits, les solutions standards restent et se montrent toujours meilleures.

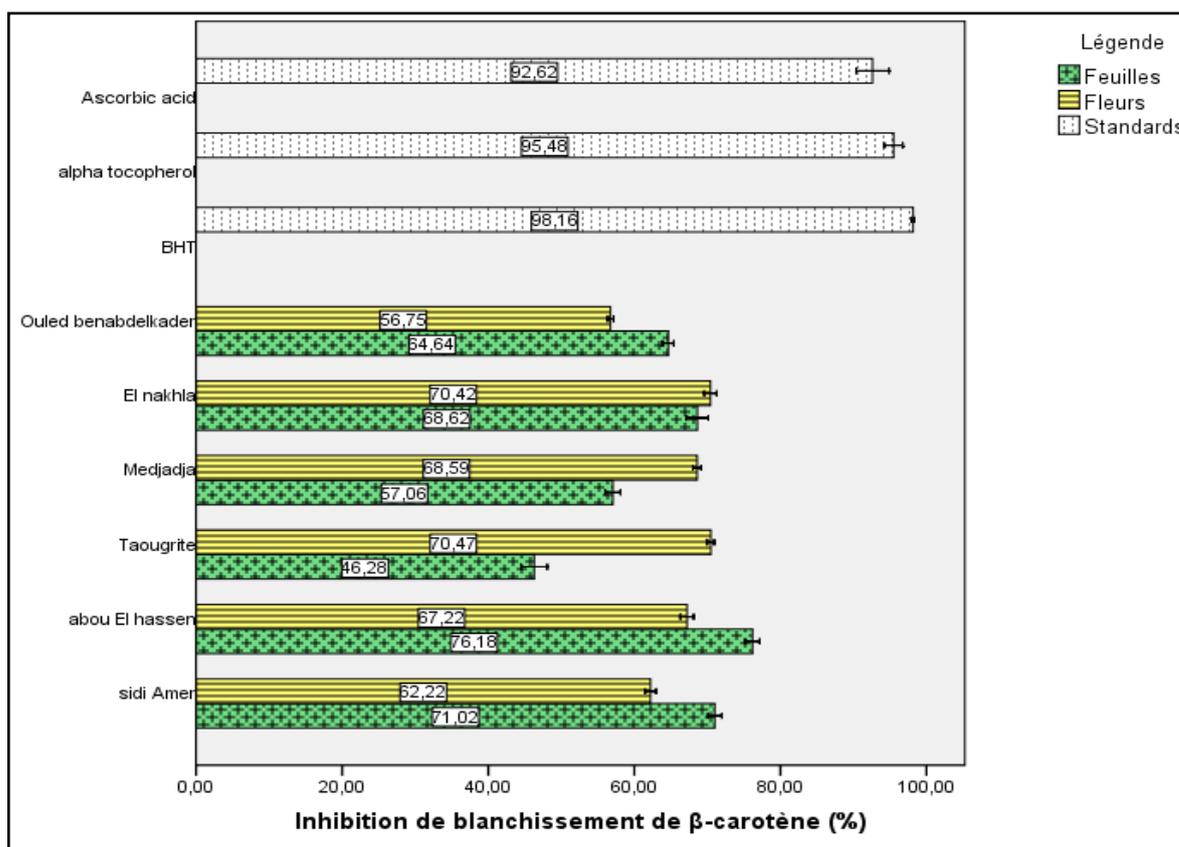


Figure 19: Taux d'inhibition de blanchissement du β -carotène des extraits de *Phlomis biloba* et des standards.

Comme nous venons de voir, nos résultats montrent une nouvelles fois que l'activité antioxydante varie selon les génotypes et aussi selon la nature des organes ayant fourni les extraits. A ce sujet, la bibliographie accrédite cela. De nombreux travaux de recherche montrent l'importance de l'activité antioxydante des membres du genre *Phlomis* dans l'émulsion β -carotène/acide linoléique. Sarikurkcu et al. (2015) ont examiné le potentiel de *P. armeniaca* qui a montré un effet ($91,50 \pm 1,82\%$) comparable à celui des antioxydants synthétiques BHA ($95,76 \pm 1,26\%$) et BHT ($93,24 \pm 0,46\%$), les espèces *P. nissolii* et *P. Pungens* var. *pungens* ont exhibé aussi un effet notable atteignant $82,02 \pm 0,05\%$ et $80,52 \pm 3,02 \%$ respectivement (Sarikurkcu et al., 2015). Les résultats de la présente étude confirment les potentialités de ce genre comme une source naturelle des antioxydants puissants et suggèrent leur utilisation comme solution alternative pour les antioxydants synthétiques notamment dans les régimes riches en matière grasse.

La variabilité génotypique sur les propriétés antioxydantes s'est exprimée aussi avec d'autres espèces médicinales telles les lavandes. En effet, dans une étude conduite sur 30 populations de lavandin, une variation distinctive est observée entre leurs propriétés antioxydantes testées par la méthode de blanchissement β -carotène avec un taux baignant dans un intervalle de 17,02 à 53,56% (Bajalan et al., 2016).

3. Corrélation entre l'activité antioxydante et la composition phytochimique

Les composés phénoliques sont connus pour leurs vertus thérapeutiques et leurs propriétés biologiques qu'ils confèrent aux plantes. Ils sont considérés parmi les classes des métabolites secondaires les plus importantes (Alasalvar et al., 2001), puisqu'ils constituent le facteur déterminant des activités anti-inflammatoire (Mohajer et al., 2005), antimicrobienne (Bahadori et al., 2015), antiviral (Wang et al., 2009), larvicide (Tepe et al., 2011), cardioprotective, neuroprotective et anticancéreuse (Crozier et al., 2009) des remèdes à base de plantes. Ces métabolites sont connus également pour leur pouvoir anti-âge (Paredes-Lopez et al., 2010) et ils sont souvent corrélés positivement avec le pouvoir antioxydant des PMs (Merouane et al., 2018). Les Tableaux 12 et 13 montrent la corrélation entre les teneurs en composés bioactifs et l'activité antioxydante de *P. biloba*.

Tableau 12: Coefficient de corrélation Pearson entre les différents essais sur les feuilles de *P. biloba*.

	Teneur en composés bioactifs			Activité antioxydante	
	CPT	FT	FOT	DPPH	β -carotène
CPT	1				
FT	0,934	1			
FOT	0,041	-0,052	1		
DPPH	-0,961**	-0,957**	-0,187	1	
β -carotène	0,623**	0,321	-0,079	-0,444	1

CPT: composés phénoliques totaux; FT: flavonoidestotaux; FOT: flavonols totaux ; DPPH: 2,2-iphényl-1-picrylhydrazyl.

** : Corrélation significative à $p < 0,01$.

D'après les valeurs de coefficient de corrélation Pearson mentionnées dans le Tableau 12, une corrélation hautement significative ($p < 0,01$) est établie entre la teneur CPT et les propriétés antioxydantes des feuilles estimées par les deux tests DPPH ($r = 961$) et blanchissement du β -carotène ($r = 623$), cette corrélation signifie que la totalité du potentiel des feuilles est attribuée aux composés phénoliques. La teneur en FT est également corrélée avec l'activité antiradicalaire DPPH des feuilles ($r = 957$; $p < 0,01$).

Tableau 13: Coefficient de corrélation Pearson entre les différents essais sur les fleurs de *P. biloba*.

	Teneur en composés bioactifs			Activité antioxydante	
	CPT	FT	FOT	DPPH	β -carotène
CPT	1				
FT	0,285	1			
FOT	0,632**	0,368	1		
DPPH	0,039	0,087	-0,322	1	
β -carotène	0,717**	-0,059	-0,080	-0,573*	1

CPT: composés phénoliques totaux; FT: flavonoïdes totaux; FOT: flavonols totaux; DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

** : Corrélation significative à $p < 0,01$.

* : Corrélation significative à $p < 0,05$.

Contrairement aux feuilles qui ont révélé un impact de la teneur phénolique sur les deux tests d'activité antioxydante, le contenu en CPT des fleurs avait un effet hautement significative seulement sur l'activité antioxydante totale évaluée par le test du blanchissement β -carotène ($r=717$; $p < 0,01$) (Tableau 13), l'activité antiradicalaire DPPH n'est pas soumise, dans cette organe de *P. biloba*, à la teneur phénolique mais elle est liée aux autres composants de la mixture chimique bioactive des extraits tel que les flavonols ($r = 0,322$).

Selon la littérature, les composés phénoliques sont souvent corrélés avec les caractéristiques antioxydantes des PMs (Merouane et al., 2018; Sarikurkcu et al., 2014). Il existe cependant quelques exceptions à cette règle où les chercheurs n'ont pas trouvé de corrélation entre ces deux paramètres (Saafi et al., 2009).

Partie III: Résultats et discussion

Chapitre 6.

Importance des particules dans les extraits

Chapitre 6. Importance des particules dans les extraits

1. Introduction

Plusieurs études ont signalé que les espèces du genre *Phlomis* possèdent un potentiel très riche en molécules bioactives telles : les phénylpropanoïdes, les irridoïdes, les diterpénoïdes, les phényléthanoïdes, les alcaloïdes (Kumar et al., 1992). Les composés phénoliques, dominés essentiellement par la classe des acides phénoliques et des flavonoïdes, comptent aussi parmi les constituants essentiels des molécules bioactives rencontrées chez les *Phlomis* (Kabouche et al., 2005; Sarikurkcu et al., 2014; Sarikurkcu et al., 2015). Ce mélange de métabolites secondaires, présent chez les *Phlomis*, offre un ensemble de propriétés thérapeutiques bénéfiques pour la santé humaine (Algieri et al., 2013; Dellai et al., 2009; Gürbüz et al., 2003; Limem-Ben Amor et al., 2009; Sarikurkcu et al., 2014; Sarikurkcu et al., 2015).

Nombreuses sont les recherches qui sont menées sur le screening des composés phénoliques et les propriétés anti oxydantes des plantes médicinales (PMs). La majorité de ses études sont conduites sur des préparations obtenues par macération ou autre procédé d'extraction de matériel végétal dans différents types de solvants (aqueux et/ou organique) suivie de filtration pour éliminer le débris végétaux.

Contrairement à ce mode opératoire, nous avons essayé, lors de cette étude, de valoriser les extraits végétaux différemment en exploitant des fractions de composants, présents à l'état micro et nanoparticulaire et qui souvent s'échappent (ou se perdent) durant l'étape de filtration. Pour cela, nous avons examiné l'impact que peut avoir l'élimination de ces particules des extraits sur le contenu phytochimique et l'activité antioxydante.

L'expérience est conduite seulement avec les extraits de feuilles de la population SAM, une population ayant montré de très bonnes performances lors des expériences précédentes.

2. Effets des particules sur le contenu phytochimique et l'activité antioxydante des extraits

2.1. Définition

Les différentes organisations internationales de standardisation donnent des définitions différentes pour les nanoparticules et les nanomatériels en fonction du domaine d'intérêt (Tableau 14). En règle générale, la taille d'une nanoparticule varie entre 1 à 100 nm et forme le principal constituant dans la fabrication des nanostructures. Une nanoparticule constitue un objet très fin, mais qui reste plus grand qu'un atome ou une molécule simple (Horikoshi et Serpone, 2013).

Tableau 14: Différentes définition de nanoparticules et nanomatériels par les organisations de standardisation (d'après Horikoshi et Serpone, 2013).

Organisation	Définition de nanoparticule	Définition de nano-matériau
ISO	Particule à diamètre entre 1–100 nm	/
ASTM	Ultrafine particule, la longueur de 2 ou 3 places est entre 1–100 nm	/
NIOSH	Particule à diamètre entre 1–100 nm ou fibre qui varie entre 1–100 nm.	/
SCCP	Au moins un côté est à l'échelle nanométrique	Matériau qui possède au moins une face ou une structure interne nanométrique
BSI	Tous les diamètres et les côtés sont à l'échelle nanométrique	Matériau qui possède au moins une face ou une structure interne nanométrique
BAuA	Tous les diamètres et les côtés sont à l'échelle nanométrique	Matériau qui consiste au nanostructure ou au nanosubstance

ISO: International Organization for Standardization, ASTM: American Society of Testing and Materials, NIOSH: National Institute of Occupational Safety and Health, SCCP: Scientific Committee on Consumer Products, BSI: British Standards Institution, BAuA: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.

La taille des nanoparticules dispersées dans les extraits végétaux est variable en fonction de l'extrait préparée (durée de macération, caractéristique de la poudre végétale, nature du solvant d'extraction, etc.). Dans une étude, conduite sur les extraits aqueux de trois variétés de thé vert, la séparation des nanoparticules par centrifugation à une vitesse

similaires à celle que nous avons appliquée (pendant 2 heures) lors de cette étude (20000 rpm), a généré des particules de tailles différentes selon la variété testée. Les tailles des particules obtenues varient entre 0,5 et 6 μm (pour la variété 1); entre 50 et 300 nm (pour la variété 2) et entre 200 à 540 nm (pour la variété 3) (Gopal et al., 2016).

2.2. Effet sur le contenu phytochimique

L'évaluation des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes dans les extraits initiaux (PM_0) obtenus par macération de feuilles de *P. biloba* dans l'eau et dans le méthanol (80%) ainsi que dans les extraits sans microparticules (PM_1) et sans nanoparticules (PM_2) sont présentés dans la Figure 20. Les micros et les nanoparticules sont éliminés des extraits initiaux par centrifugation à $11929 \times g$ et à $47718 \times g$ respectivement.

Les résultats (Figure 20 A) montrent que les extraits méthanoliques initiaux (PM_0) sont riches en CPT et en FT. En effet, les teneurs en CPT ont pu atteindre les $81,80 \pm 2,25 \mu\text{g}$ EAG/mg de MS) et en FT les $10,38 \pm 0,55 \mu\text{g}$ EQ/mg de MS. Même les extraits sans microparticules (PM_1) semblent garder de bonnes teneurs en CPT et en FT. L'élimination des microparticules des extraits n'a pas entraînée des variations significatives ($p > 0,05$) par rapport aux contenus des extraits initiaux. Effectivement, les taux obtenus sont de l'ordre de $80,25 \pm 1,89 \mu\text{g}$ EAG/mg MS pour les CPT et de $10,67 \pm 0,41$ EQ/mg pour les FT.

C'est surtout avec l'élimination des nanoparticules des extraits méthanoliques initiaux (PM_2) que les teneurs en CPT connaissent des baisses considérables (Figure 20 A). Effectivement, les taux enregistrés en CPT, dans les extraits (PM_2), ont chuté jusqu'à $24,43 \pm 0,59 \mu\text{g}$ GAE/mg MS contre $81,80 \pm 2,25 \mu\text{g}$ EAG/mg de MS (PM_0) et $80,25 \pm 1,89 \mu\text{g}$ EAG/mg MS (PM_1). Contrairement aux CPT, les teneurs en FT, ne semblent pas avoir été affectées par l'élimination des nanoparticules des extraits (PM_2) puisqu'elles ont enregistré une valeur de $9,96 \pm 0,37 \mu\text{g}$ EQ/mg MS, valeur qui ne présente pas de différences significatives ($p > 0,05$) par rapport aux contenus initiaux de l'extrait méthanolique (Figure 20 A).

Dans une étude réalisée par Do et al. (2014) sur plusieurs extraits végétaux, l'extrait hydro-méthanolique a prouvé une efficacité remarquable dans la solubilisation des composés bioactifs (Do et al., 2014).

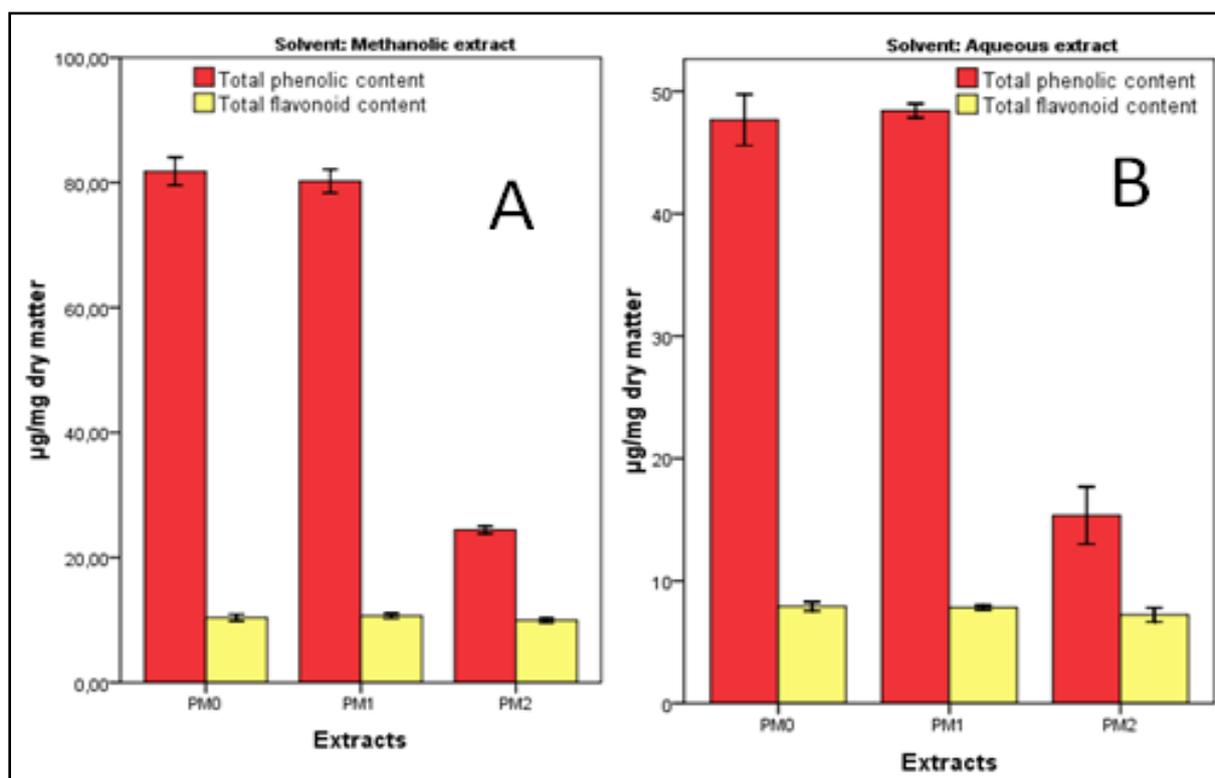


Figure 20: Teneur en composés bioactifs de l'extrait méthanolique (A) et aqueux (B) de *P. biloba*. PM₀: extrait sans macroparticules; PM₁: extrait sans microparticules; PM₂: extrait sans nanoparticules.

L'évaluation des contenus en CPT et en FT (Figure 20 B) montre que les extraits aqueux sont moins pourvus en molécules bioactives que les extraits méthanoliques. Les meilleures teneurs en CPT sont celles obtenues sur les extraits PM₁ ($48,42 \pm 0,57 \mu\text{g GAE/mg MS}$) et PM₀ ($47,66 \pm 2,08 \mu\text{g GAE/mg MS}$). L'élimination des microparticules des extraits aqueux, n'affecte nullement les teneurs en CPT et ne présentent aucune différence significative ($p > 0,05$) entre elles. C'est surtout lors de la phase d'élimination des nanoparticules des extraits que les teneurs en CPT chutent (particulièrement avec les extraits aqueux et à un degré moindre avec les extraits méthanoliques) (Figure 21).

Quant au contenu en FT, les teneurs ne connaissent pas de fluctuations notables que ce soit avant ou après l'élimination des micros ou des nanoparticules. Les valeurs en FT obtenues $7,91 \pm 0,36$ (PM₀), $7,81 \pm 0,22$ (PM₁) et $7,23 \pm 0,56$ (PM₂) $\mu\text{g EQ/mg MS}$ ne présentent aucune différence significative entre elles.

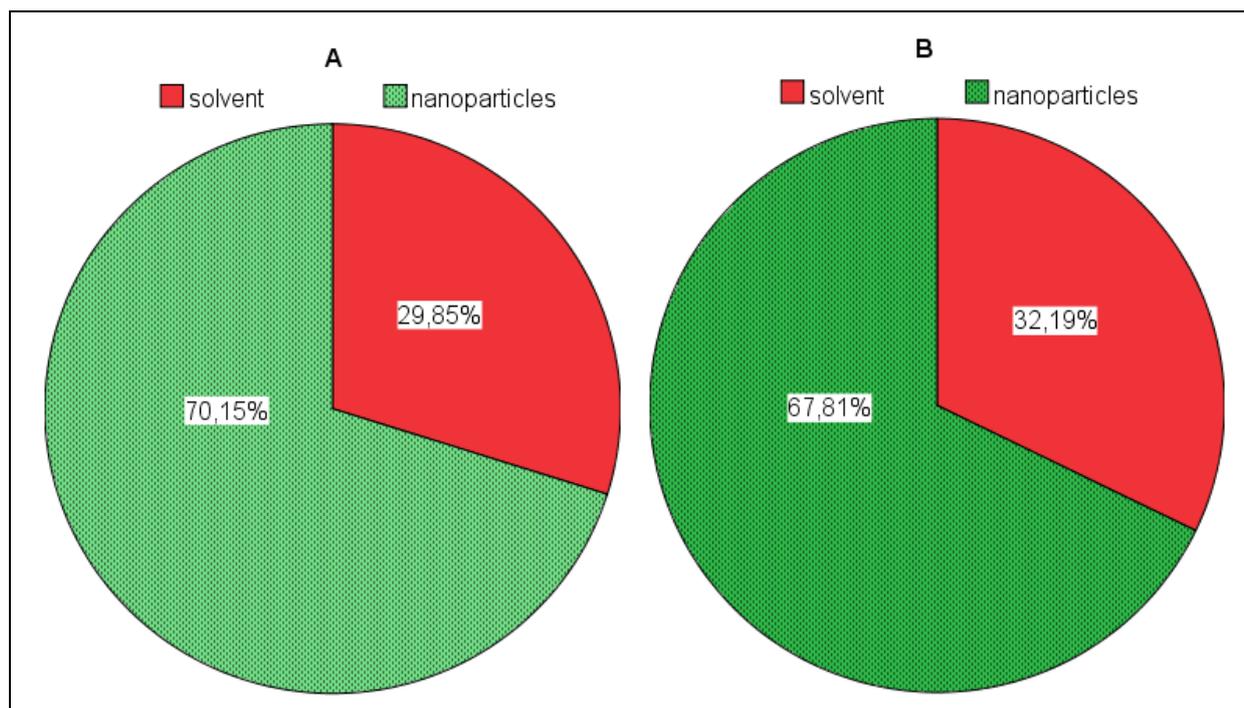


Figure 21: Importance des nanoparticules dans la teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique (A) et aqueux (B) de *P. biloba*.

Les résultats des analyses nous ont permis de confirmer que notre plante *P. biloba* peut constituer une source très riche en composés phénoliques et en flavonoïdes. De nombreux auteurs rapportent que l'espèce *P. biloba*, comme la majorité des membres du genre *Phlomis* L., est très riche en polyphénols particulièrement dominés par des acides phénoliques (Sarikurkcu et al., 2014; Sarikurkcu et al., 2015; Zhang and Wang, 2009) et par des flavonoïdes (Kabouche et al., 2005; Kumar et al., 1992).

Lors de cette étude, nous avons pu mettre en évidence, l'importance des nanoparticules comme constituants essentiels parmi les composés phénoliques totaux contenus dans extraits méthanoliques et /ou aqueux. Nos résultats corroborent avec ceux rapportés par l'équipe de Gopal et al., (2016) qui confirment l'importance des particules dans les extraits de thé verts particulièrement des nanoparticules qui constituent une fraction majeure des CPT. Cela justifie la diminution des teneurs en CPT après l'élimination de ce type de particules des extraits initiaux PM_{10} . Le contenu en FT dans les extraits avec ou sans particules a montré des teneurs relativement similaires. Les mêmes conclusions ont été rapportées par Gopal et al. (2016) dans une étude conduite sur le thé vert.

Les nanoparticules sont caractérisées par des propriétés physico-chimiques distinctives telles que le point de fusion, la superficie spécifique, les propriétés optiques spécifiques, la magnétisation et la force mécanique. Ces propriétés attribuent aux nanoparticules plusieurs applications industrielles (Horikoshi et Serpone, 2013) alimentaires (additifs alimentaires, emballage...) (Houdeau et al., 2015) et pharmaceutiques (drug delivery) et cosmétiques comme filtres solaires (Cortial, 2015). La performance et les propriétés des nanoparticules ne dépendent pas seulement de la composition chimique de leurs matières, mais aussi de la charge de la surface, la forme et la taille (Steichen et al., 2013).

Malgré les différences des teneurs en CPT et en FT dans les deux extraits méthanoliques et aqueux, le comportement général était similaire après l'élimination des différentes fractions. Ceci peut être attribué à la ressemblance des particules suspendues dans les deux extraits qui viennent d'un même matériel végétal, bien que la solubilisation dépend aussi des propriétés physiques (la densité, la viscosité et la charge ionique) des solvants utilisés dans l'extraction (Akbulut et al., 2012) qui sont relativement comparables notamment avec l'inclusion de l'eau dans l'extrait méthanolique à un taux de 20% qui joue le rôle d'un facteur de rapprochement des caractéristiques physiques des deux extraits. D'après les résultats de notre recherche bibliographique, nous n'avons rencontré aucune étude ayant traité le suivi de la cinétique des CPT et FT dans divers solvants d'extraction après élimination des fractions micro et nano particulaires des extraits. La présente étude est la première contribution dans ce domaine.

L'utilisation d'une température constante de 4 °C durant la séparation des particules des extraits végétaux est recommandée pour protéger les composés phénoliques contre l'oxydation, mais aussi pour améliorer l'efficacité de la centrifugation par le maintien d'une viscosité stable durant le processus de séparation (Kowalczyk et Lagzi, 2011). Selon les résultats d'une étude conduite par Akbulut et al. (2012), la viscosité d'une suspension aqueuse s'amplifie sous l'effet du réchauffement de l'appareil centrifugeuse qui a fait passer la température de 22 à 28 °C durant 8 min de centrifugation à 16000 × g.

2.3. Impact sur le pouvoir antioxydant

Les extraits pourvus ou non de particules sont examinés pour leurs potentiels antioxydants par les mêmes tests précédemment utilisés à savoir: le test antiradicalaire DPPH et le test de blanchissement β -carotène (Tableau 15).

Tableau 15: activité antioxydante de différents extraits de *P. biloba* avec et sans particules.

Echantillon	Extraits	DPPH (IC ₅₀ : mg MS/mL)	Inhibition de blanchissement β - carotène (%)
Extrait Méthanolique	PM ₀	1,04 ± 0,02 ^a	74,49 ± 1,42 ^a
	PM ₁	1,18 ± 0,14 ^a	71,57 ± 1,89 ^a
	PM ₂	4,17 ± 0,29 ^b	20,51 ± 1,42 ^b
Extrait Aqueux	PM ₀	1,70 ± 0,14 ^c	40,18 ± 0,22 ^c
	PM ₁	1,68 ± 0,22 ^c	38,58 ± 0,67 ^c
	PM ₂	3,07 ± 0,26 ^d	29,26 ± 1,56 ^d

Notes: a–e: les valeurs (moyenne ± écart type, n=3) de la même colonne marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$),

IC₅₀: la concentration de l'extrait permettant de réduire la concentration initiale du radical DPPH à 50%,

MS: matière sèche de matériel végétal,

PM₀: extrait sans macroparticules; PM₁: extrait sans microparticules; PM₂: extrait sans nanoparticules.

Les résultats des deux tests (Tableau 15), montrent que tous les extraits initiaux (PM₀) méthanoliques ou aqueux, manifestent de bonnes potentialités antioxydantes avec le test antiradicalaire DPPH. En effet, avec les extraits méthanoliques et aqueux, les IC₅₀ ont été atteintes avec 1,04 ± 0,02 et 1,70 ± 0,14 mg MS/mL respectivement. Le test d'inhibition de blanchissement β -carotène a marqué aussi un pouvoir appréciable avec une supériorité remarquable ($p < 0,05$) de l'extrait méthanolique (PM₀=74,49±1,42%) par rapport à l'extrait aqueux (40,18±0,22%). Ces valeurs confirment les potentialités de *P. biloba*, comme une source d'antioxydants naturels puissants, mentionnées dans le chapitre 5.

L'analyse des résultats du Tableau 15 montre aussi que l'activité antioxydante suit la même allure de la teneur en CPT après l'élimination des différentes fractions de particules. L'élimination des microparticules n'a pas modifié significativement ($p > 0,05$) le pouvoir

antioxydant des extraits. C'est l'élimination des nanoparticules (PM_2) qui semble réduire fortement cette activité biologique. Effectivement nous relevons que l' IC_{50} a été quadruplé dans l'extrait méthanolique et presque doublé dans l'extrait aqueux. On note cependant que malgré cette baisse, par rapport aux extraits initiaux PM_0 , l'effet antiradicalaire des extraits (PM_2) demeure important.

Les résultats du test de blanchissement β -carotène confirment davantage ceux obtenus avec le test DPPH avec une variation relative liée au système d'évaluation (Kim et al., 2012). En effet, les pertes dans l'activité antioxydante entre les extraits pourvus de nanoparticules et ceux qui en sont dépourvus, sont édifiantes. En éliminant les nanoparticules, l'extrait méthanolique semble perdre environ 72,46% de son pouvoir antioxydant alors que l'extrait aqueux en perd 27,18% seulement de ses capacités (Figure 22). Ces valeurs indiquent clairement l'impact de l'élimination des nanoparticules sur les deux solvants d'extraction. L'effet le plus important est remarqué dans l'extrait aqueux, cette variation est en relation avec la nature et la concentration des composés bioactifs contenus dans chaque extrait.

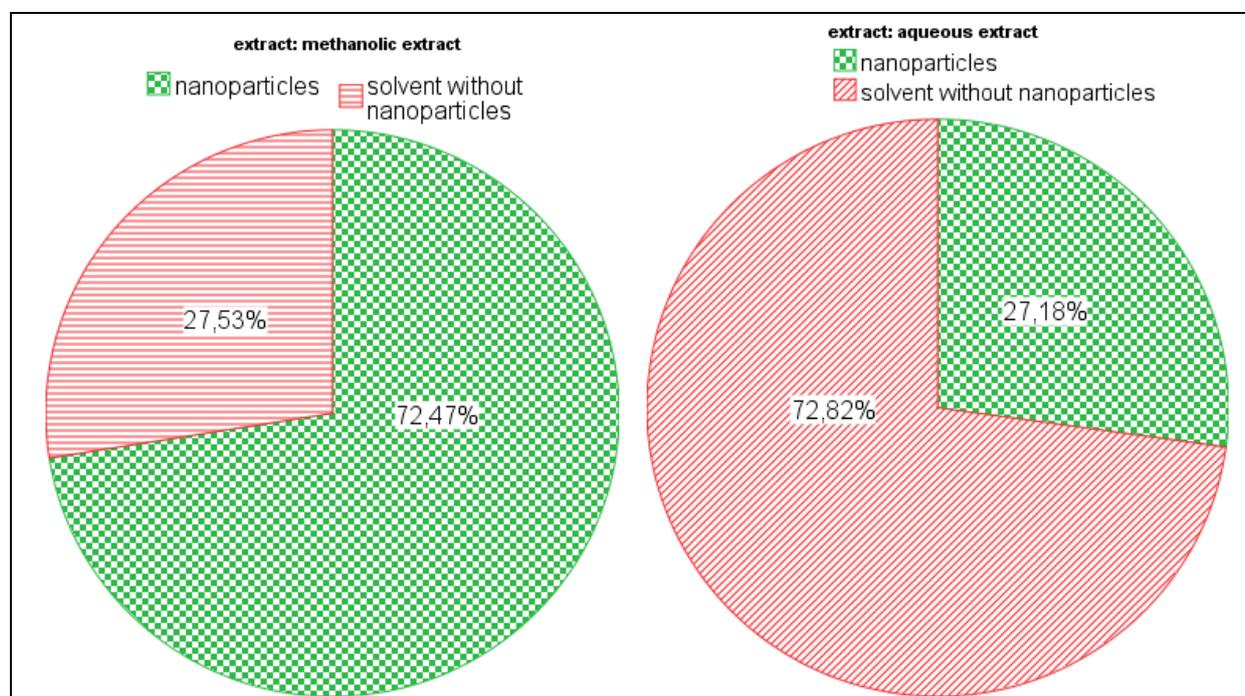


Figure 22: Importance des nanoparticules des extraits dans l'inhibition de blanchissement β -carotène.

Dans une étude réalisée par Gopal et al. (2016) sur l'impact de l'élimination des nanoparticules sur l'activité anti-DPPH de trois marques commerciales de thé vert nommées

Iced green tea, Boseong green tea et Lipton green tea, les nanoparticules ont montré un potentiel antiradicalaire DPPH de l'ordre de 25, 66 et 77% respectivement. Nos résultats concordent avec cette étude qui confirme que la rétention des nanoparticules dans les extraits végétaux améliore leurs capacités antioxydantes.

Nombreuses sont les études qui confirment le rôle clé que peuvent jouer les nanoparticules dans l'amélioration des propriétés biologiques des extraits végétaux. Des auteurs comme Pool et al. (2012) ont mis en évidence les vertus antioxydants et anti-inflammatoires de la quercétine, une molécule bioactive appartenant aux flavonols, véhiculée parmi les nanovecteurs produits de polylactique-co-acide glycolique (PLGA). Cette même molécule (quercétine-PLGA) est citée par Chakraborty et al. (2012) comme étant une nanoparticule qui exerce une action anti-inflammatoire 4,5 fois plus efficace que la quercétine libre contre un endommagement oxydatif gastrique (induit par l'alcool dans un modèle de rats). Aussi, l'équipe de Wu et al. (2008) confirme l'efficacité du potentiel antioxydant de la quercétine.

Le Tableau suivant (16) montre la corrélation (coefficient de Pearson) entre les paramètres testés sur les extraits préparés de *P. biloba*. D'une façon générale, l'activité antioxydante est hautement corrélée ($P < 0,01$) avec la teneur en CPT dans l'extrait méthanolique ($r_{\text{DPPH}} = 0,995$, $r_{\beta\text{-carotène}} = 0,998$) et aqueux ($r_{\text{DPPH}} = 0,975$, $r_{\beta\text{-carotène}} = 0,958$). Ces résultats confirment, encore une fois, l'efficacité des composés phénoliques comme facteur déterminant du potentiel antioxydant dans les extraits de l'espèce *P. biloba*. La teneur en FT est corrélée elle aussi positivement avec la capacité d'inhibition de la décoloration du β -carotène de l'extrait aqueux ($r = 0,753$, $p < 0,05$) et de l'extrait méthanolique ($r = 0,550$, $p > 0,05$).

Tableau 16: Coefficient de corrélation Pearson entre les différents essais sur les extraits de *P. biloba*.

	Extrait méthanolique				Extrait aqueux			
	CPT	FT	DPPH	β-carotène	CPT	FT	DPPH	β-carotène
CPT	1				1			
FT	0,592	1			0,605	1		
DPPH	-0,995 ^b	-0,536	1		-0,975 ^b	-0,527	1	
β-carotène	0,998 ^b	0,550	-0,997 ^b	1	0,958 ^b	0,753 ^a	-0,908 ^b	1

CPT: composés phénoliques totaux; FT: flavonoïdes totaux; DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

a: Corrélation significative à $p < 0,05$.

b: Corrélation significative à $p < 0,01$.

La présente étude, met en évidence le rôle clé joué par les différentes fractions constituants les extraits de *P. biloba*. En effet, le pouvoir antioxydant des extraits s'est montré tributaire surtout des constituants nano-particulaires des extraits (constituants déterminants dans les réactions antioxydantes). La rétention du nano-régime dans ces extraits est hautement recommandée pour améliorer leurs potentiels thérapeutiques. Les nanoparticules occupent aussi une part importante dans le contenu (poly)phénolique des extraits. Quant aux fractions macro-particulaires, elles n'affectent pas trop l'activité biologique.

Partie III: Résultats et discussion

Chapitre 7.

Valorisation des produits de *P. biloba*

Chapitre 7. Valorisation des produits de *P. biloba*

Les plantes médicinales sont universellement reconnues comme une source importante de composés phénoliques. Elles sont exploitées en phytothérapie sous différentes formes pharmaceutiques applicables sur le corps ou utilisées comme thé ou solutions buvables. Dans le présent chapitre, nous ambitionnons la possibilité d'exploitation de *P. biloba*, prouvée par ses potentialités phénoliques (chapitres 5 et 6), dans un enrichissement direct d'aliment modèle à base d'agar-agar par le biais de la déshydratation osmotique (DOS) afin d'améliorer leur potentiel antioxydant.

Le procédé de DOS est une méthode de traitement des produits alimentaires ou biologiques. Elle est largement appliquée dans l'enrichissement des aliments solides (Djendoubi, 2012). Cette méthode consiste à mettre en contact l'aliment avec des solutions généralement concentrées à plus basse température possible et à l'abri de l'oxygène (puisque'il est immergé), ce qui est particulièrement favorable pour les produits sensibles aux réactions de dégradation oxydative et thermique (Bchir, 2011).

1. Composés phénoliques et enrichissement alimentaire

L'enrichissement ou la fortification alimentaire est l'addition à un aliment un ou plusieurs nutriments afin de prévenir ou de corriger une carence affirmée en un ou plusieurs nutriments dans la population ou dans des groupes de populations spécifiques (FAO/WHO, 1994). Le taux d'enrichissement dépend des besoins nutritionnels des groupes cibles, de la consommation de l'aliment enrichi, de la biodisponibilité du fortifiant et de la législation des pays (Berger, 2003).

L'enrichissement des aliments en micronutriments est une approche pertinente et d'une grande importance dans la lutte contre les carences à conséquences physiologiques et économiques non négligeables notamment dans les pays en voie de développement (CIN, 1992). Cette approche est qualifiée de meilleur solution coût-efficacité pour améliorer la santé publique des populations cibles ce qui constitue un gage de pérennité (World Bank, 1994).

Aujourd'hui, les métabolites secondaires des plantes ont acquis un grand intérêt, particulièrement les composés phénoliques vu leurs propriétés thérapeutiques et nutritionnelles reconnues (Morand et Milenkovic, 2014), et exploitées dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (Phoon et al., 2018). Dans ce dernier secteur, plusieurs techniques ont été adoptées afin d'améliorer la teneur phénolique des aliments à savoir la sélection de variétés riches en biomolécules (la création de nouvelles variétés, l'utilisation des fruits venus de régions à conditions climatiques et environnementales adéquates...) dans les processus de transformation alimentaire, l'utilisation des approches biologiques permettant l'élévation de l'expression des gènes modulant la teneur et la composition phénolique tel que la méthode CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (McDougall, 2016), bien que les techniques exploitées en technologie alimentaire visent l'enrichissement direct des aliments (Rózek et al., 2007).

2. Teneur de l'aliment modèle en composés bioactifs

Après préparation de la solution osmotique (extrait aqueux) et de l'aliment modèle agar-agar (selon le protocole décrit en matériel et méthode, chapitre 3), nous avons procédé à l'étape de l'enrichissement par le processus de déshydratation osmotique (DOS). Le modèle d'aliment est immergé dans 200 mL de la solution osmotique pendant 4, 8, 12, et 24 h à 4°C et à l'abri de la lumière avec contrôle du pH avant et après l'enrichissement.

La valeur du pH de l'extrait végétal a indiquée 5,7 avant l'imprégnation et 5,5, 24 heures après. En effet, ces valeurs montrent que le pH de la solution osmotique a connu une certaine stabilité avec une légère fluctuation durant la période d'enrichissement.

La Figure 23 représente l'impact de l'imprégnation phénolique de l'aliment modèle dans l'extrait de feuille de *P. biloba* Desf. (population SAM), en fonction du temps. Les résultats expriment les teneurs des molécules bioactives (CPT et FT) ayant diffusé dans l'aliment modèle en fonction du temps d'imprégnation. Nous constatons que les teneurs en CPT augmentent au fur et à mesure que le temps d'imprégnation augmente. Après seulement 4 heures d'exposition dans l'extrait aqueux, le contenu en CPT est passé de 0 à $704,17 \pm 45,58$ mg EAG/100g d'aliment. Après 24 heures d'imprégnation, ce taux a grimpé pour atteindre les $1023,33 \pm 75,10$ mg EAG/100g d'aliment.

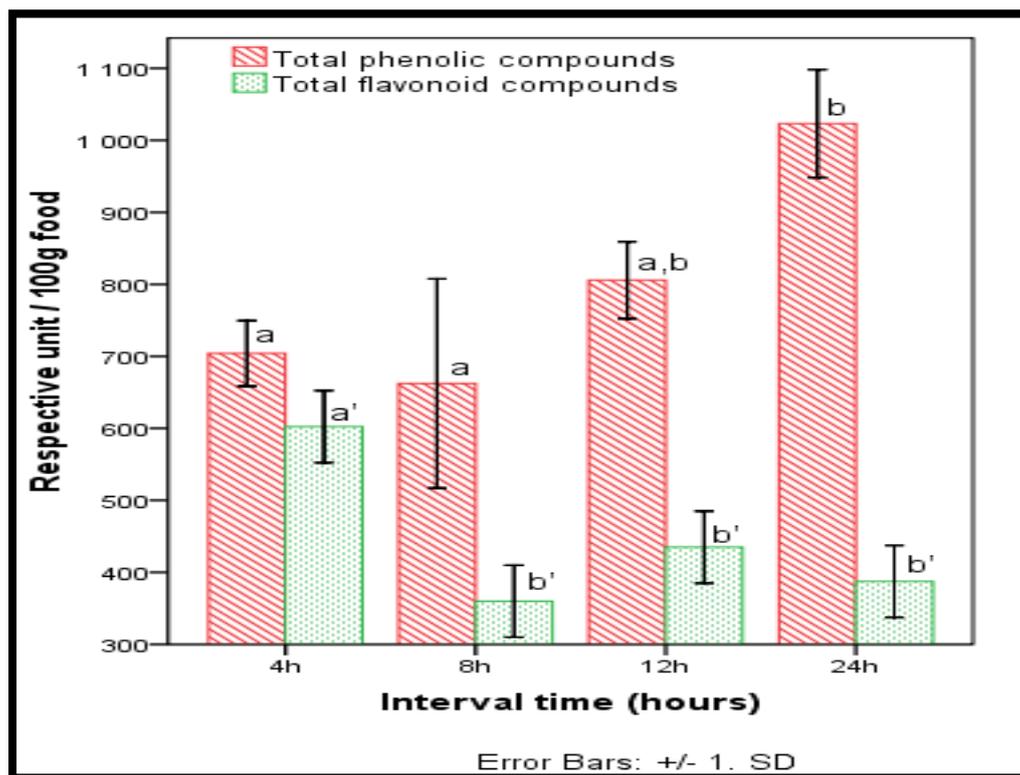


Figure 23: Teneur en composés phénoliques (mg EAG) et en flavonoïdes (mg EO) contenue dans 100 g d'aliment modèle enrichi par l'extrait aqueux de *P. biloba* en fonction du temps d'imprégnation. Les différentes lettres pour un même paramètre signifient des valeurs différentes significativement ($p < 0,05$).

Le contenu en polyphénols des fragments d'agar-agar croît en fonction du temps d'imprégnation. Cela signifie que l'aliment modèle n'a pas atteint le seuil de saturation en composés phénoliques totaux et pouvait recevoir davantage de molécules phénoliques. La diffusion des solutés continue donc de se faire tant qu'il y a des différences de potentiel osmotique entre l'extrait aqueux d'un côté et l'aliment modèle de l'autre. Deux composants essentiels créent les potentiels osmotiques (les concentrations en sucres et en composés phénoliques dissous). L'enrichissement de l'aliment modèle en composés phénoliques se poursuit jusqu'à l'arrivée au point d'équilibre, défini par l'égalité des concentrations phénoliques entre l'extrait de la plante et l'aliment (Barat et al., 1998).

La diffusion lente des composés phénoliques totaux à travers l'aliment est attribuée au maillon d'agar-agar gênant le passage des polyphénols bien que leurs poids moléculaires peuvent empêcher certains constituants phénoliques d'entrer à l'aliment (Rózek et al., 2007).

Concernant la diffusion des FT (Figure 23), nous constatons que les plus fortes teneurs ($602,50 \pm 50,0$ mg EQ/100g d'aliment) pénètrent dans l'aliment au cours des 4 premières heures d'imprégnation dans l'extrait aqueux. Cette teneur représente en fait, plus de 85% des CPT diffusant dans l'aliment pendant la même durée d'imprégnation (4 heures). Cela signifie que les flavonoïdes sont les premiers constituants phénoliques atteignant l'aliment modèle. Après 8, 12 et 24 heures d'imprégnation, les quantités en FT diffusant dans l'aliment, affichent un déclin très significatif ($p < 0,05$) comparativement à la dose préalablement annoncée (celle ayant diffusé pendant 4 heures).

D'une façon générale, les composés à faibles poids moléculaires, à l'instar des acides phénoliques, passent les premiers vers l'aliment modèle (Rózek et al., 2007), ce qui justifie le passage de fortes teneurs dans l'aliment après une courte période d'imprégnation (4 heures).

Rózek et al. (2007) ont enrichi un aliment modèle (agar-agar) semblable au notre, par deux jus de raisin rouge, l'un concentré à 40% et l'autre à 60% (solide/soluble). Après 24h d'imprégnation, l'aliment s'est enrichi de $650,4 \pm 29,4$ mg EAG/100g (avec le jus à 40%) et de $420,3 \pm 10,6$ mg EAG/100g (avec le jus concentré à 60%). A titre de comparaison, nous constatons que nos résultats, obtenus après 24 heures d'imprégnation, sont nettement meilleurs que ceux annoncés par Rózek et al. (2007).

Les teneurs en composés phénoliques, obtenus lors de cette étude, dans les conditions de DOS, paraissent très élevés comparativement aux résultats rapportés pour certains fruits et légumes reconnus par leur richesse phénolique (Tableau 17).

Tableau 17: Teneur phénolique pour certains fruits et légumes (intervalles de plusieurs variétés) comparativement à l'aliment modèle enrichi en *P. biloba*.

Fruit / Légume	Teneur phénolique (mg acide gallique/100g MF*)	Référence
Aliment modèle	1023,33**	Notre résultat
Mûres noir et bleu	26,7 – 961	(Balasundram et al., 2006)
Fraises	160 – 225	
Prunes	174 – 368,6	(Chun et al., 2005)
Pamplemousses	161,7	
Choux	45 – 92,5	
Épinards	32,5 – 100	(Ciešlik et al., 2006)
Brocolis	25 – 290	
Onion rouge	154,10	(Marinova et al., 2005)
Persil	188,0	

* MF: matière fraîche

** Résultat exprimé en mg EAG/100g d'aliment obtenu après 24h d'imprégnation.

Les caractéristiques de la solution osmotique peuvent influencer l'enrichissement phénolique des aliments essentiellement par sa concentration en sucres. Effectivement, une concentration glucidique dépassant les 55% de la fraction soluble peut gêner considérablement la pénétration de différents constituants bioactifs par la formation d'une couche sur la surface de l'aliment ou par l'augmentation de la viscosité empêchant ainsi la circulation de ses constituants (Mujica-Paz et al., 2003; Raoult-Wack et al., 1991).

S'agissant de la diffusion des FT dans l'aliment modèle, dans une étude similaire au notre, menée avec du jus de raisin concentré comme solution d'enrichissement, la quercétine et la rutine se sont révélés comme étant les flavonoïdes majoritaires ayant diffusé durant tout le processus de DOS (Rózek et al., 2007). Les mêmes auteurs notent l'absence de deux flavonoïdes : (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, parmi les constituants de l'aliment, malgré leurs présences dans la solution osmotique (jus de raisin) et malgré leurs poids moléculaires proches à celui de la quercétine et la rutine. L'absence de certains composés est due probablement d'après Rózek et al. (2007) à leur oxydation durant la

procédure expérimentale. Si nous faisons un parallèle avec nos résultats (Figure 23) relatifs à la diminution des teneurs en FT dans l'aliment modèle lorsque la durée d'imprégnation dépasse les 4 heures ; il est fort possible que cela était dû à un phénomène d'oxydation des FT qui s'est produit durant la procédure expérimentale.

Les composés phénoliques sont caractérisés par une complexité énorme. Les flavonoïdes représentent l'un des groupes les plus importants dans la classe des polyphénols. Ils sont rarement libres dans les aliments, mais généralement conjugués à des glucides, acides et alcools (Harborne, 1993). En plus des potentiels biologiques qu'ils assurent aux aliments, les flavonoïdes confèrent des propriétés sensorielles et des saveurs spécifiques (fruits et légumes) (Drewnowski et Gomez-Carneros, 2000). L'enrichissement alimentaire par les fruits et les sous produits de fruits peut constituer une approche industrielle prometteuse dans l'amélioration des qualités nutritionnelles de certains aliments (Ranawana et al., 2016).

D'une façon générale, la présence des composés phénoliques dans les aliments contribue considérablement à leurs propriétés biologiques bénéfiques pour la santé humaine. La consommation de ces métabolites secondaires est associée aux différents effets avantageux allant de la réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer bien que la prévention contre les anomalies neurodégénératives (Del Rio et al., 2010).

L'intérêt des composés phénoliques augmente dans l'industrie alimentaire puisqu'ils retardent la dégradation oxydante des lipides et améliorent la qualité et la valeur nutritive des aliments (Aneta et al., 2007). Par conséquent, l'évaluation des teneurs phénoliques des plantes permet leur valorisation comme source de molécules bioactives pour une utilisation thérapeutique et nutritionnelle (Di maro et al., 2013).

Actuellement, le procédé de DOS est largement appliqué dans l'enrichissement des aliments solides (Djendoubi, 2012). Compte tenu de sa richesse en composés phénoliques, la plante *P. biloba* peut constituer une excellente source de ces métabolites secondaires bioactifs. Nous avons pu mettre en évidence, à travers cette étude, qu'il est possible d'enrichir un aliment modèle par des composés phénoliques provenant de poudres de

feuilles de *P. biloba*. Il est donc fort possible d'étendre cette expérience d'enrichissement à des aliments réels. En effet, l'exploitation des extraits de cette plante en vue d'enrichir des aliments appauvris en polyphénols peut constituer une excellente piste de recherche. La réalisation de cet enrichissement sur des aliments réels nécessite aussi des investigations supplémentaires afin de déterminer l'effet de la structure et la composition chimique de l'aliment sur la mixture phénolique des solutions osmotiques. L'aliment modèle enrichi en extrait de *P. biloba* affiche un double contenu en flavonoïdes des aliments les plus riches en cette fraction phénolique (mûre noire, mûre bleu), bien qu'il dépasse largement les autres fruits et légumes (Tableau 18).

Tableau 18: Teneur en flavonoïdes totaux pour certains fruits et légumes comparativement à l'aliment modèle enrichi en *P. biloba*.

Fruit/légume	Teneur phénolique (mg Catéchine /100 g MF*)	Référence
Aliment modèle	387,5 ± 50**	Notre résultat
Mûre noire	201	Casarin, 2012
Mûre noire	190,30	
Prune	136,20	
Onion rouge	18,7	Marinova et al., 2005
Persil	48,5	
Brocolis	18,8	
Laitue	97,20	
Mandarine	4,00	Recuenco et al., 2016
Dattes	1,06 – 4,13	Ali haimoud et al., 2016

* MF: matière fraîche

** Résultat exprimé en mg Equivalents Quercétine/100g d'aliment obtenu après 24h d'imprégnation.

Les exemples réussis, conduites dans le domaine de l'enrichissement des aliments, ne manquent pas. Citons seulement deux exemples où l'addition de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* a généré un effet sur les propriétés physiques, sensorielles et antioxydantes de pain sans gluten. Le TPC et l'activité antioxydante des extraits ont augmenté avec l'addition de la poudre de feuilles de *Moringa*. L'ajout de la poudre déjà pour

2,5% a entraîné une forte augmentation du contenu de TPC (de 0,88 à 2,12 GAE/g MS). L'activité antioxydante la plus élevée pour le piégeage du DPPH a été trouvée pour 7,5% et pour 10% de l'addition de la poudre de Moringa.

Les résultats obtenus ont montré que l'enrichissement osmotique par l'extrait de *P. biloba* était plus fiable que l'enrichissement par ajout direct de poudre de Moringa oleifera durant la préparation d'un pain sans gluten, dont la teneur phénolique était $239,0 \pm 10,0$ mg EAG/100g MS du pain additionné de 10% de poudre de *M. oleifera* (Bourekoua et al., 2017). En outre, les variétés de dattes les plus consommées apparaissent moins riches (240,38 à 505,49 mg EAG/100g MS) en CPT (Kchaou et al., 2014) devant l'aliment traité par l'extrait de *P. biloba*.

La teneur de l'aliment modèle en molécules bioactives montre l'efficacité de la DOS comme une technique de production des aliments enrichis en composés phénoliques par exploitation des PMs connues par leurs potentialités biologiques élevées. Notre investigation est l'étude pionnière.

3. Potentiel antioxydant de l'aliment modèle enrichi

3.1. Activité anti-radicalaire DPPH•

Dans cette partie, nous avons évalué la capacité anti-radicalaire de l'aliment à chaque intervalle d'imprégnation (4, 8, 12 et 24h) par deux concentrations 10 et 20 mg/mL pour une meilleure appréciation du comportement du pouvoir antioxydant de l'aliment. Les résultats présentés dans la Figure 24 sont exprimés en taux d'inhibition (%) du radical libre DPPH•.

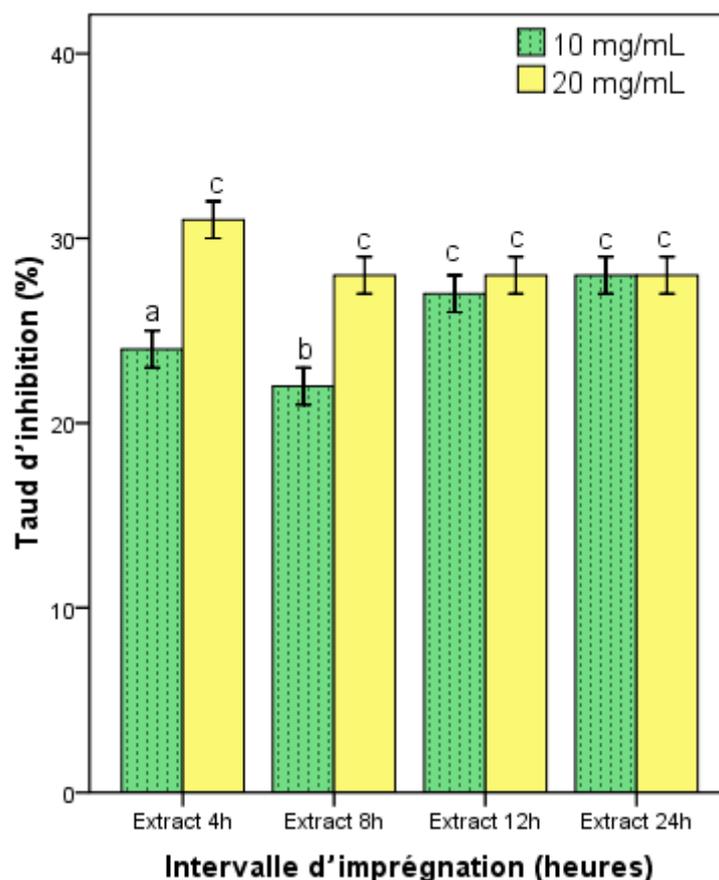


Figure 24: Cinétique de l'activité anti-radicalaire DPPH• de l'aliment modèle en fonction du temps d'imprégnation. a-c: les bars marqués par des lettres différentes ont des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).

A la lecture des résultats, nous constatons que l'augmentation de la concentration d'extrait d'aliment de 10 à 20 mg/mL n'a pas eu d'effet significatif sur le taux d'inhibition du radical libre DPPH• surtout pendant les temps d'imprégnation de 12 et 24h ($p < 0,05$). On note cependant, des différences significatives entre les deux concentrations durant les temps 4 et 8h. En effet, l'activité anti-radicalaire s'est fortement exprimée avec la concentration de 20 mg/mL, ce qui nous ramène à déduire que le potentiel anti-DPPH• est déterminé non seulement par la concentration de l'aliment mais aussi par la nature des constituants qu'il renferme.

Les résultats obtenus, montrent aussi que malgré, les potentialités anti-radicalaires satisfaisantes ($31 \pm 1,00$ %) manifestées par l'aliment (concentré à 20 mg/mL et imprégné pendant 4 h), celles développées par le BHT demeurent de loin plus performantes ($94,15 \pm 0,95$ %). Néanmoins, le potentiel anti-radicalaire de l'aliment enrichi à l'extrait aqueux de *P. biloba* reste de qualité satisfaisante comme une source naturelle.

L'étude menée par Rózek et al. (2007) sur un aliment (du même modèle que le notre) enrichi de jus de raisin rouge, montre contrairement à nos résultats, que plus le temps d'imprégnation de l'aliment est long et plus son pouvoir anti-radicalaire est meilleur.

L'enrichissement de certains aliments par des poudres de feuilles riches en composés phénoliques leur confèrent d'excellentes aptitudes anti-radicalaires. C'est le cas par exemple de l'étude menée par Costa de Camargo et al. (2014) où l'addition de peaux de cacahouètes à des gâteaux enrichi fortement son contenu en fibres, en polyphénols et par la même, améliore ses capacités antioxydantes. L'étude en question montre que l'activité antioxydante des gâteaux a été améliorée 36 à 251%. Aussi, selon Bourekoua et al. (2017), l'ajout direct de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* à du pain sans gluten (aliment pauvre en polyphénols), a amélioré considérablement sa composition en composés phénoliques et aussi ses potentialités antioxydantes.

3.2. Activité d'inhibition de blanchissement du β -carotène

Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant de l'aliment modèle enrichi par l'extrait aqueux de *P. biloba*, nous avons expérimenté un test supplémentaire qu'est le test de blanchissement β -carotène/acide linoléique. Les résultats de cet essai sont représentés dans la Figure 25.

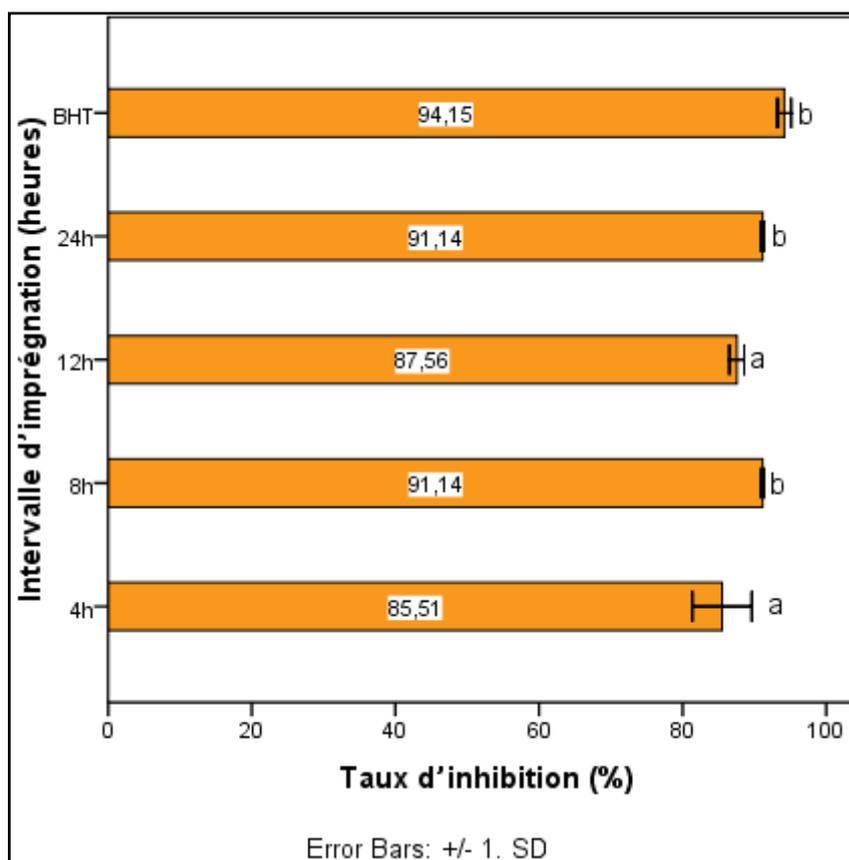


Figure 25: Taux d'inhibition de blanchissement du β -carotène de l'aliment dans différents intervalles d'imprégnation. a-b: les bars marqués par des lettres différentes ont des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).

Contrairement aux résultats modérés de l'activité anti-radicalaire, mise en évidence par le test DPPH•, l'aliment exprime mieux ses capacités antioxydantes avec le test β -carotène/acide linoléique. Effectivement, avec l'aliment (concentré à 2 mg/mL), le taux d'inhibition a atteint les $85,51 \pm 4,14$ % après 4h d'imprégnation seulement. Ce taux s'est vu grimper jusqu'à atteindre les $91,14 \pm 0,20$ %, une valeur qui rivalise avec celle du BHT ($p < 0,05$) après 8h d'enrichissement. Un léger déclin est enregistré à 12h d'imprégnation pour reprendre ensuite son envolé et se maintenir à $91,14 \pm 0,20$ % à l'intervalle (24h).

Les variations observées entre les résultats de l'activité anti-radicalaire des deux tests (DPPH et β -carotène/acide linoléique), sont probablement dues à la variation de la nature des composés bioactifs intervenant et aux mécanismes réactionnels impliqués dans chaque type de test. Néanmoins, il ya lieu de noter que malgré ces différences, les deux tests mettent en évidence la présence d'une activité biologique efficace de l'extrait de *P. biloba* qui leur permet de dépasser même les capacités de certains fruits reconnus pour leurs pouvoirs antioxydants.

Notons par ailleurs, que l'usage du test de blanchissement de β -carotène dans l'évaluation de l'activité antioxydante des aliments enrichis s'est révélé très performant. Les résultats obtenus sont très encourageants et mettent nettement en exergue les bonnes capacités antioxydantes de la plante *P. biloba*. Il serait très intéressant de poursuivre les travaux de cette étude en envisageant l'enrichissement d'un aliment réel déficient en composés phénoliques.

Les résultats de l'activité antioxydante suggèrent que l'enrichissement des aliments par les extraits des PMs pourrait constituer une bonne méthode pour les valoriser en tant que source d'antioxydants naturels. Il existe aussi d'autres méthodes d'enrichissement prometteuses qui peuvent améliorer significativement les propriétés antioxydantes des aliments à l'instar de l'ajout direct des jus de fruits dans les aliments solides tel que le pain (Ranawana et al., 2016) et la viande pour inhiber la peroxydation lipidique (McDougall et al., 2016).

La substitution du BHT (conservateur utilisé comme additif alimentaire ainsi que dans les produits d'hygiène) par des extraits naturels de *P. biloba* serait aussi une autre piste très intéressante à explorer. En effet, le BHT malgré ses bienfaits dans la conservation, il est aussi connu pour être un facteur de risque pouvant porter atteinte aux reins, au foie, à l'estomac et même provoquer des allergies cutanées (Rebecca et al., 2002). L'ensemble des techniques d'enrichissement peuvent constituer une substitution à l'utilisation des antioxydants synthétiques au niveau industriel et donnent une valeur ajoutée aux aliments par l'amplification de leur contenu phénolique.

Partie III: Résultats et discussion

Chapitre 8.

Diversité génétique des populations de *P. biloba*

Chapitre 8. Diversité génétique des populations de *P. biloba*

La mise en évidence de la diversité génétique entre les six populations de *P. biloba* étudiées d'une part et la détermination des liens existants entre les populations et leur distribution géographique dans la région de Chlef, d'autre part, sont deux principaux objectifs visés par la présente étude.

1. Evaluation de la quantité et la qualité d'ADN extrait

Après extraction, selon le protocole décrit dans le kit commercial, la qualité des ADN extraits des six populations de *P. biloba*, a été contrôlée par spectrophotométrie (basée sur la mesure de l'absorbance des acides nucléiques dans l'UV: rapport Ab_{260}/Ab_{280}). Dans l'ensemble, les valeurs obtenues (tableau 15) se situent dans un intervalle allant de 1,79 à 1,91 à l'exception de la population ENK qui a affiché une valeur légèrement inférieure à la norme.

Pour la mesure de la concentration d'ADN des six populations, les résultats obtenus sont satisfaisants et sont compris entre 234,5 à 270,0 ng/ μ L (Tableau 15). Cela signifie que le degré de pureté (compris entre 1,8 et 2) ainsi que les concentrations en ADN sont acceptables pour entamer la phase d'amplification par PCR.

Tableau 19: Qualité et quantité d'ADN extrait des populations de *P. biloba*

Population	Ab_{260}	Ab_{280}	rapport de Ab_{260}/Ab_{280}	concentration d'ADN (ng/ μ L)
MEJ	0,540	0,290	1,86	270,0
ENK	0,498	0,277	1,79	249,0
OAK	0,501	0,261	1,91	250,5
SAM	0,504	0,269	1,87	252,0
TAW	0,469	0,245	1,91	234,5
AHS	0,494	0,274	1,80	247,0

Ab_{260} : absorbance de l'échantillon d'ADN à 260 nm.

Ab_{280} : absorbance de l'échantillon d'ADN à 280 nm.

2. Résultats d'amplification ISSR/PCR

En tout, 20 amorces ont été utilisées pour évaluer le polymorphisme génétique entre les six populations de *P. biloba*. Seulement dix, parmi les vingt, se sont révélées efficaces et présentent des profils lisibles. La différence de densité des bandes reflète le nombre de copies pour chaque séquence amplifiée. Le nombre de bandes diffère d'une amorce à l'autre. Les bandes identiques correspondent à l'amplification d'une même séquence d'ADN.

2.1. Analyse des produits ISSR/PCR

2.1.1. L'amorce UBC807

L'amorce UBC807 a généré 8 fragments dont la taille varie entre 200 et 650 paires de base (pb). Le taux de polymorphisme obtenu est de 100% (avec 8 bandes polymorphes) (Tableau 20 et Figure 26).

Tableau 20: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC807.

UBC807	N° Bande	PM (pb)	Populations						P (%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') AGAGAGAGAGAGAGT	1	200	1	1	1	0	1	0	
	2	250	1	0	1	1	0	0	
	3	300	1	0	0	1	0	0	
	4	350	0	1	0	0	0	0	
	5	400	1	1	1	1	0	0	
	6	450	0	0	0	1	0	0	
	7	500	1	1	1	0	1	0	
	8	650	0	0	1	0	0	0	
	T=8		5	4	5	4	2	0	
Nombre de bandes polymorphes	8		5	4	5	4	2	0	100%
Nombre de bandes monomorphes	0		0	0	0	0	0	0	0%

P (%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: OuledBenabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

2.1.2. L'amorce UBC810

L'analyse des produits générés par l'amorce UBC810 est répertoriée dans le Tableau 21. Le profil électrophorétique obtenu par l'amorce UBC810 présente 8 fragments dont la taille varie de 200 à 650 pb, avec un taux de polymorphisme égal à 87,5 % (avec 7 bandes polymorphes). Les résultats montrent que certaines populations possèdent plusieurs bandes en commun, c'est le cas pour les populations MEJ et ENK qui partagent 5 bandes identiques et les populations OAK, SAM, TAW et AHS. La population SAM a généré un nombre de bandes intermédiaires mais elle possède une bande spécifique d'une taille de 600 pb (Figure 26).

Tableau 21: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC810.

UBC810	N° bande	PM (pb)	Populations						P (%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') GAGAGAGAGAGAGAT	1	200	1	1	0	0	0	0	
	2	300	1	1	1	1	1	1	
	3	350	1	1	0	0	1	1	
	4	400	1	1	0	0	1	0	
	5	450	0	0	1	1	0	0	
	6	500	1	1	1	1	0	0	
	7	600	0	0	0	1	0	0	
	8	650	0	0	1	1	0	0	
		T=8		5	5	3	5	4	2
Nombre de bandes polymorphes	7		4	4	2	4	3	1	87,5%
Nombre de bandes monomorphes	1		1	1	1	1	1	1	12,5%

P (%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouledbenabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

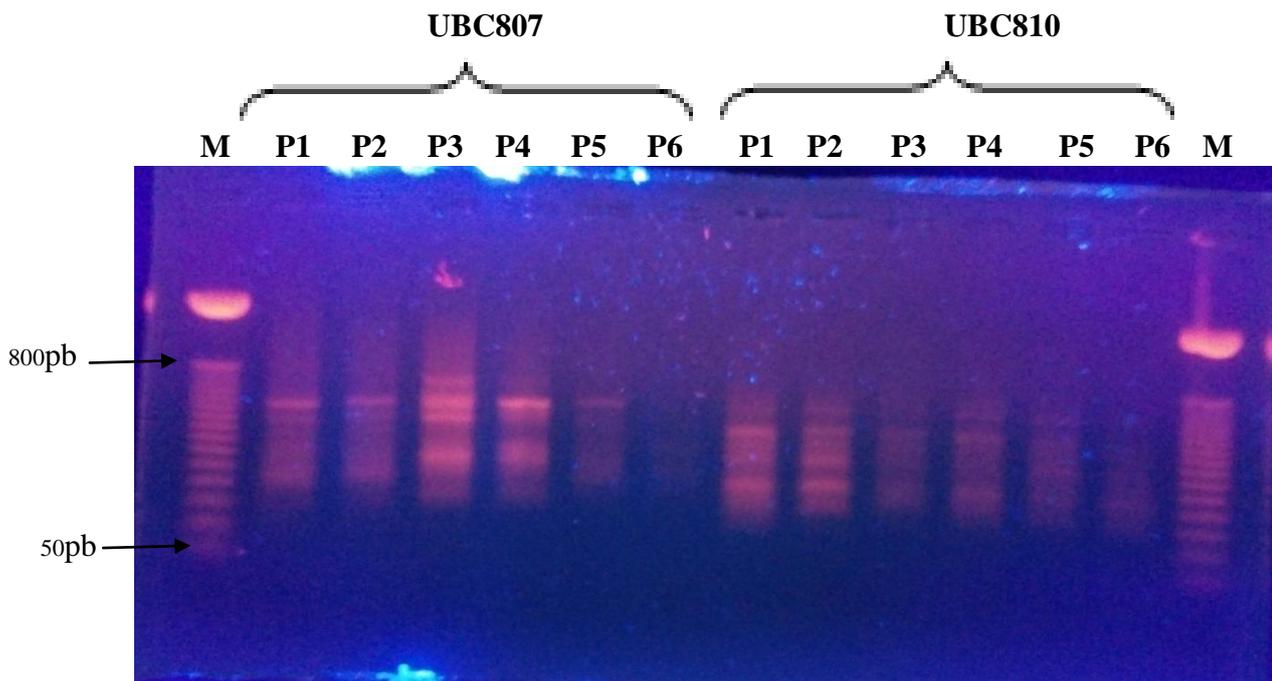


Figure 26: Profils électrophorétiques ISSR des populations de *P. biloba* générés par les amorces UBC807 et UBC810. P1: Medjadja (MEJ); P2: El-Nakhla (ENK); P3: Ouled benabdelkader (OAK); P4: Sidi Amer (SAM); P5: Taougrite (TAW); P6: Abou El Hassen (AHS); M: marqueur moléculaire (50-800 pb).

2.1.3. L'amorce UBC811

Les produits de l'amplification de cette amorce montrent un polymorphisme de 92,30% avec des bandes spécifiques pour les populations MEJ, ENK et TAW dont les tailles sont respectivement de 250, 200, 150 et 300pb (Tableau 22). Les six populations sont caractérisées par une bande commune d'une taille de 600 pb. Les profils électrophorétiques sont mentionnés dans la Figure 27.

Tableau 22: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC811.

UBC811	N° bande	PM (pb)	Populations						P (%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') GAGAGAGAGAGAGAC	1	150	0	0	0	0	1	0	
	2	200	0	1	0	0	0	0	
	3	250	1	0	0	0	0	0	
	4	300	0	0	0	0	1	0	
	5	350	0	0	1	1	1	0	
	6	400	0	1	1	1	1	1	
	7	450	1	1	1	1	0	1	
	8	500	1	1	0	1	1	0	
	9	550	1	1	1	0	1	1	
	10	600	1	1	1	1	1	1	
	11	650	1	0	1	1	0	0	
	12	700	1	0	0	0	0	0	
	13	750	1	1	1	1	0	0	
		T= 13		8	7	7	7	7	4
Nombre de bandes polymorphes	12		7	6	6	6	6	3	92,30%
Nombre de bandes monomorphes	1		1	1	1	1	1	1	7,69%

P%: taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

2.1.4. L'amorce UBC818

L'amorce UBC818 a permis de générer 11 bandes dont les tailles varient de fragments ont été générés dont la taille varie de 200 à 700pb, avec un taux de polymorphisme de 100% de (11 bandes polymorphes) (Tableau 23 et Figure 27).

Tableau 23: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC818.

UBC818	N° Bande	PM (pb)	Populations						P%
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') CACACACACACACAG	1	200	0	0	0	1	1	1	
	2	250	1	1	1	0	0	0	
	3	300	1	0	0	0	1	1	
	4	350	1	1	1	0	0	1	
	5	400	1	1	1	1	0	0	
	6	450	1	0	0	1	1	0	
	7	500	1	1	1	0	0	0	
	8	550	1	1	1	1	0	0	
	9	600	1	0	0	1	0	0	
	10	650	0	0	1	0	0	0	
	11	700	0	0	0	1	0	0	
	T= 11		8	5	5	6	3	3	
Nombre de bandes polymorphes	11		8	5	5	6	3	3	100%
Nombre de bandes monomorphes	0		0	0	0	0	0	0	0%

P (%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

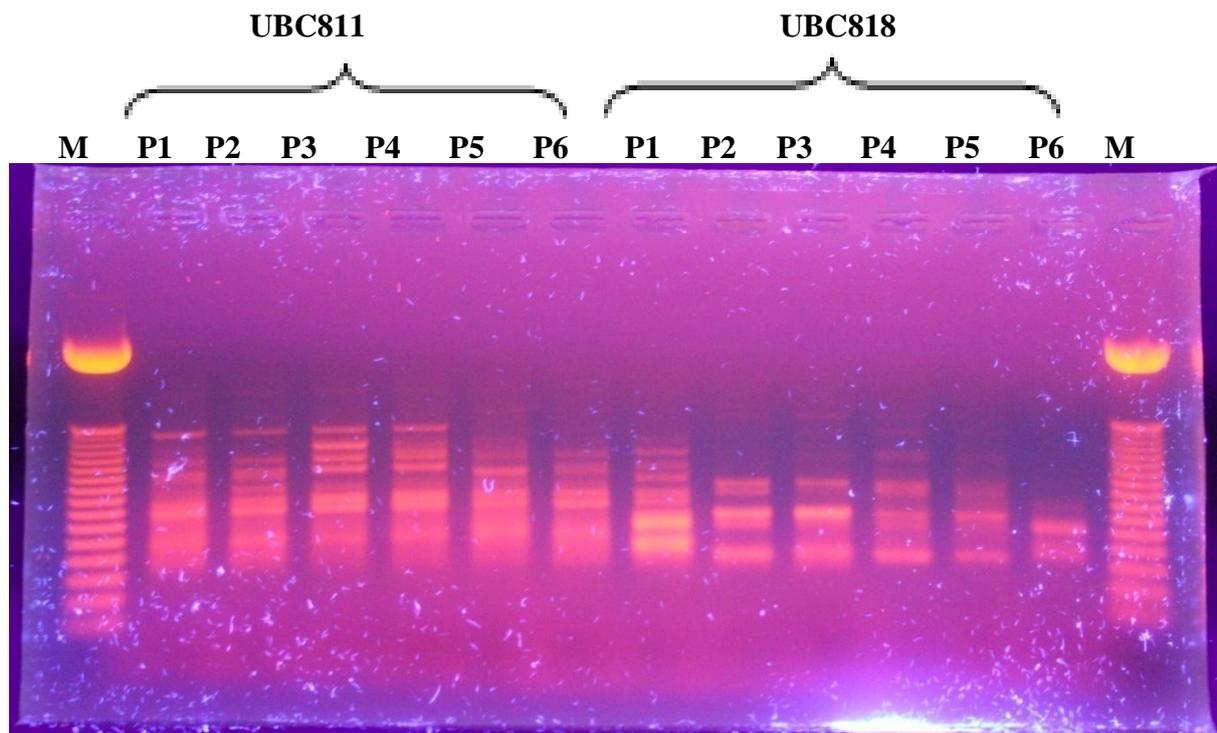


Figure 27: Profils électrophorétiques ISSR des populations de *P. biloba* générés par les amorces UBC811 et UBC818. P1: Medjadja (MEJ); P2: El-Nakhla (ENK); P3: Ouled benabdelkader (OAK); P4: Sidi Amer (SAM); P5: Taougrite (TAW); P6: Abou El Hassen (AHS); M: marqueur moléculaire (50-800 pb).

2.1.5. L'amorce UBC823

L'amorce UBC823a généré 6 bandes allant de 200 à 550pb de taille. Le taux de polymorphisme obtenu est de 100% (6 bandes polymorphes) (Tableau 24 et Figure 28).

Tableau 24: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC823.

UBC823	N° Bande	PM (pb)	Populations						P (%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') TCTCTCTCTCTCTCC	1	250	0	0	0	1	0	0	
	2	300	1	1	1	0	0	0	
	3	350	0	1	0	0	0	0	
	4	400	1	0	0	1	0	0	
	5	450	0	0	0	1	0	0	
	6	550	1	1	1	1	0	0	
	T= 6		3	3	2	4	0	0	
Nombre de bande polymorphes	6		3	3	2	4	0	0	100%
Nombre de bande monomorphes	0		0	0	0	0	0	0	0%

P (%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

2.1.6. L'amorce UBC824

L'amorce UBC824 a généré 2 fragments de 200 et 450 pb de taille, avec un taux de polymorphisme de 50 % (1 bande polymorphe) (Tableau 25 et Figure 28).

Tableau 25: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC824.

UBC824	N° Bande	PM (pb)	Populations						P (%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') TCTCTCTCTCTCTCG	1	200	1	1	1	1	1	1	
	2	450	1	1	0	0	0	0	
	T=2		2	2	1	1	1	1	
Nombre de bandes polymorphes	1		1	1	0	0	0	0	50%
Nombre de bandes monomorphes	1		1	1	1	1	1	1	50%

P (%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

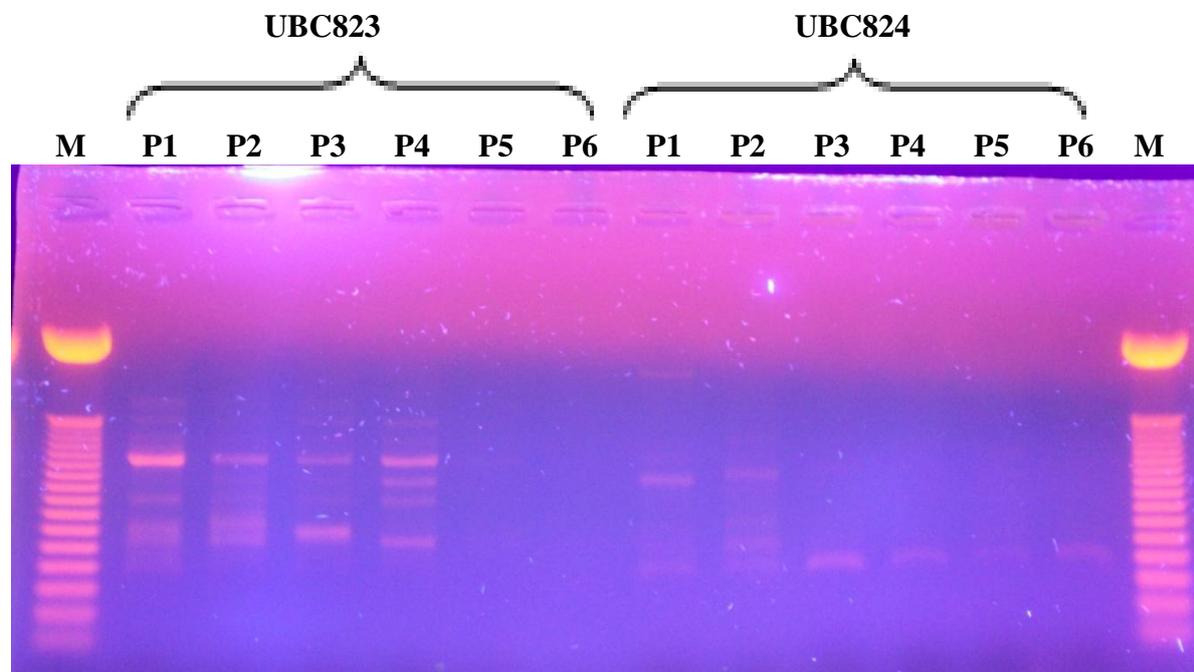


Figure 28: Profils électrophorétiques ISSR des populations de *P. biloba* générés par les amorces UBC823 et UBC824. P1: Medjadja (MEJ); P2: El-Nakhla (ENK); P3: Ouled benabdelkader (OAK); P4: Sidi Amer (SAM); P5: Taougrite (TAW); P6: Abou El Hassen (AHS); M: marqueur moléculaire (50-800 pb).

2.1.7. L'amorce UBC834

L'amorce UBC834 a permis de générer trois bandes de 250, 400 et 550pb dont deux bandes sont communes aux six populations. Le taux de polymorphisme a atteint les 33,33% (Tableau 26 et Figure 29).

Tableau 26: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC834.

UBC834	N° bande	PM (pb)	Populations						P (%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') AGAGAGAGAGAGAGYT	1	250	0	0	0	0	1	1	
	2	400	1	1	1	1	1	1	
	3	550	1	1	1	1	1	1	
	T= 3		2	2	2	2	3	3	
Nombre de bandes polymorphes	1		2	2	2	2	2	2	33,33%
Nombre de bandes monomorphes	2		0	0	0	0	1	1	66,66%

P (%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

2.1.8. L'amorce UBC836

L'amorce UBC836 a permis de générer 4 bandes dont 2 polymorphes. On note aussi que la population AHS s'est distinguée par la présence d'une bande spécifique de taille de 150 pb (Tableau 27 et Figure 29).

Tableau 27: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC836.

UBC836	N° bande	PM (pb)	Populations						P (%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') AGAGAGAGAGAGAGYA	1	150	0	0	0	0	0	1	
	2	250	0	1	1	1	1	1	
	3	300	1	1	1	1	1	1	
	4	400	1	1	1	1	1	1	
	T= 4		2	3	3	3	3	4	
Nombre de bandes polymorphes	2		0	1	1	1	1	2	50%
Nombre de bandes monomorphes	2		2	2	2	2	2	2	50%

P(%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen

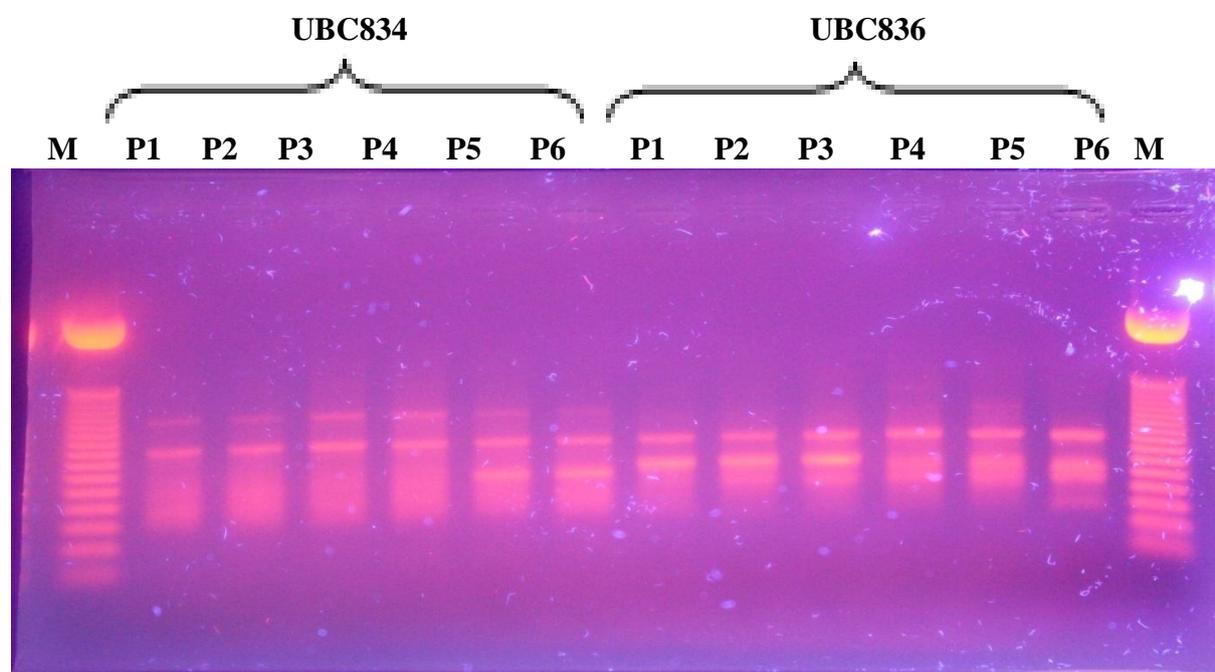


Figure 29: Profils électrophorétiques ISSR des populations de *P. biloba* générés par les amorces UBC834 et UBC836. P1: Medjadja (MEJ); P2: El-Nakhla (ENK); P3: Ouled benabdelkader (OAK); P4: Sidi Amer (SAM); P5: Taougrite (TAW); P6: Abou El Hassen (AHS); M: marqueur moléculaire (50-800 pb).

2.1.9. L'amorce UBC846

L'amorce UBC846 présente 6 bandes dont la taille varie de 150 à 550 pb et un taux de polymorphisme de 100% de (6 bandes polymorphes). On note aussi que la population TAW s'est caractérisée par la présence de 2 bandes spécifiques de taille de 250 et 450 pb (Tableau 28 et Figure 30).

Tableau 28: Analyse de produits des populations de *P. biloba* générés par l'amorce UBC846.

UBC846	N° bande	PM (pb)	Populations						P(%)
			MEJ	ENK	OAK	SAM	TAW	AHS	
Séquence (5'→3') CACACACACACACART	1	150	0	0	1	1	0	0	
	2	200	1	0	1	1	0	1	
	3	250	0	0	0	0	1	0	
	4	300	1	0	1	1	1	0	
	5	450	0	0	0	0	1	0	
	6	550	1	0	1	1	1	0	
	T=6		3	0	4	4	4	1	
Nombre de bandes polymorphes	6		3	0	4	4	4	1	100 %
Nombre de bandes monomorphes	0		0	0	0	0	0	0	0 %

P(%): taux de polymorphisme; T: nombre total de bandes; 0: absence; 1: présence; MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

3. Polymorphisme Intra spécifique

D'après les résultats du Tableau 30, nous constatons que le taux de polymorphisme le plus élevé (84,61%) a été enregistré par les populations MEJ et SAM. Ces dernières ont donné un nombre de 39 bandes polymorphes. Chacune de ces populations s'est caractérisée par des bandes spécifiques. Une population comme MEJ, s'est caractérisée par la présence d'une bande de 250pb, générée par l'amorce UBC811, alors que la population SAM, elle s'est distinguée par deux bandes spécifiques de 250 et de 450pb, générées par l'amorce UBC818 et une troisième de 250pb amplifiée par l'amorce UBC823. Les populations ENK, OAK et TAW ont également enregistré des taux de polymorphisme importants (de 75,86 à 82,85%). Les plus faibles taux de polymorphisme (66,66%) ont été enregistrés par la population AHS.

Tableau 30: Polymorphisme populationnel de l'espèce *P.biloba*

Population	Nombre de bandes	Nombre de bandes monomorphes	Nombre de bandes polymorphes	Polymorphisme (%)
MEJ	39	6	33	84,61
ENK	33	6	27	81,81
OAK	35	6	29	82,85
SAM	39	6	33	84,61
TAW	29	7	22	75,86
AHS	21	7	14	66,66

MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

Les résultats de l'analyse de la diversité génétique entre les six populations de *P. biloba*, obtenus avec les 10 amorces ISSR, nous ont permis de construire un dendrogramme (Figure 31) illustrant la relation entre ces populations en fonction du taux de similarité (obtenu par l'indice de similarité Jaccard).

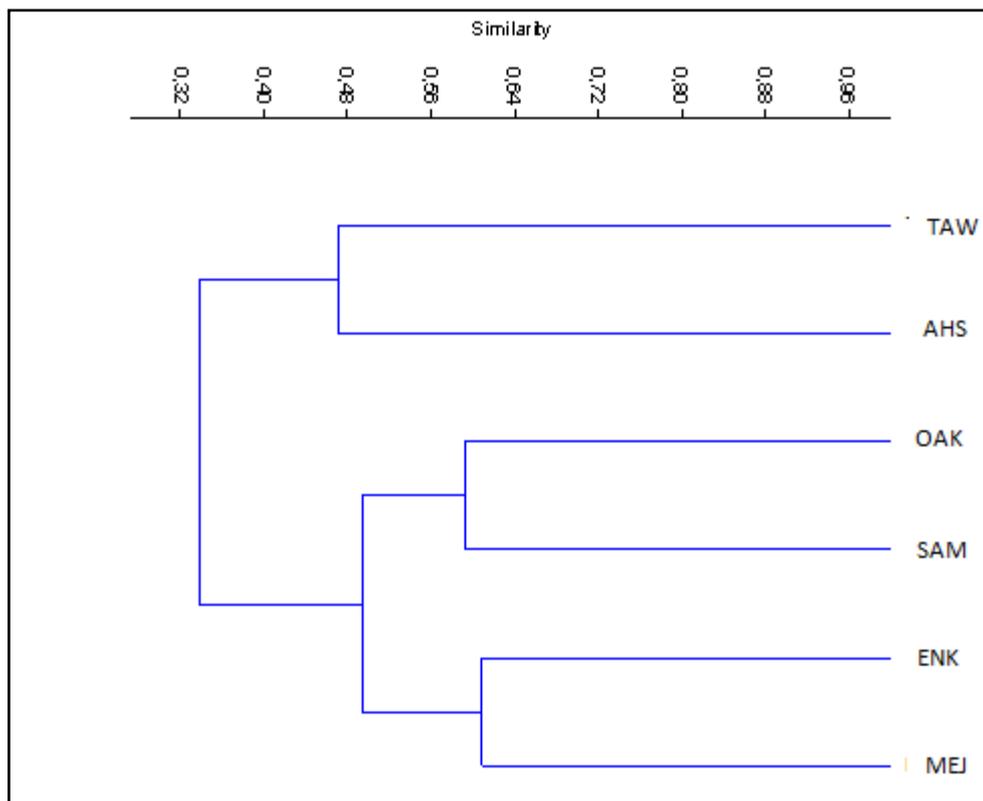


Figure 31: Dendrogramme des six populations de *P. biloba* étudiées par des marqueurs ISSR basé sur l'indice de similarité Jaccard. MEJ: Medjadja; ENK: El-Nakhla; OAK: Ouled benabdelkader; SAM: Sidi Amer; TAW: Taougrite; AHS: Abou El Hassen.

Les résultats du dendrogramme révèlent que les populations que nous avons récoltées de la région Nord de la wilaya de Chlef, présentent beaucoup de similarité entre elles et sont classées au sein d'un même groupe et celles récoltées des régions Sud se réunissent, à leur tour, dans un autre groupe. A travers les résultats de cette analyse, nous pouvons dire que la variation génétique de *P. biloba*, est en partie, modulée par le facteur environnement (situation géographique). En effet, les populations qui étaient proches géographiquement ne présentaient pas beaucoup de variabilité génétique entre elles et vice versa.

La zone de distribution géographique de l'espèce *P. biloba* est très large incluant toute la région méditerranéenne. Cela justifie l'importance de sa diversité génétique même dans une région restreinte comme celle de Chlef. La diversité génétique d'une espèce ou d'une population est l'un des critères important d'évolution continue ou d'adaptation à une nouvelle situation (Das et al., 2013). Dans notre étude, l'analyse par des amorces ISSR, a montré une diversité génétique importante entre les populations de *P. biloba* récoltées du territoire de la wilaya de Chlef. Le spectre de distribution géographique est un facteur décisif

dans la diversité génétique des espèces, dont les espèces à une distribution géographique large sont généralement caractérisées par une diversité génétique importante comparativement à celles limitées dans une région étroite (Hamrick, 1983; Karron, 1991).

4. Corrélation entre la diversité génétique et la variabilité phytochimique

La diversité génétique et la caractérisation phytochimique sont deux outils essentiels dans l'étude de la diversité des espèces végétales et particulièrement des PMs (Oliveira et al., 2012). Dans la présente étude, la diversité génétique a montré une variabilité notable entre les six populations de *P. biloba* modulée par le facteur environnement (situation géographique), d'autre part, la caractérisation phytochimique, procédée par l'analyse quantitative des composés phénoliques, a divulgué aussi une variation importante que ce soit au niveau inter-population ou intra-population (organe: feuilles et fleurs). La variation phytochimique n'est pas spécifique à l'espèce *P. biloba*, mais elle est attribuée à leur tour au facteur génotypique, environnemental et aux conditions de croissance de chaque population (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013; Lamien-Meda et al., 2010; Shahidi et Naczka, 1995).

La corrélation entre ces deux paramètres est généralement relative et discutable. Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'indépendance des deux outils de biodiversité génétique et phytochimique à l'instar d'une étude réalisée sur plusieurs cultivars de *Ficus carica* L. exploitant des marqueurs moléculaires et un ensemble de data des phénols, des stérols et des triterpène (Oliveira et al., 2012). Dans une autre étude conduite sur les populations de *Cynomorium songaricum*, la diversité révélée par les marqueurs ISSR était très divergente de celle phytochimique (analyse des composés phénoliques) (Liu et al., 2013). Cependant, dans d'autres travaux, les auteurs confirment plutôt que la diversité génétique est reflétée dans les profils biochimiques des plantes (Morone-Fortunato et al., 2010).

Conclusions et Perspectives

Comme nous l'avons annoncé en introduction, la présente étude ambitionnait d'atteindre deux principaux objectifs à savoir: une caractérisation des composés phénoliques présents dans différents extraits de feuilles et de fleurs, provenant de six populations de *P. biloba*, récoltées de la région de Chlef et aussi une caractérisation moléculaire (par l'emploi de microsatellites ISSR) des différentes populations étudiées en vue de mettre en évidence la variabilité génétique existante (entre populations) et ses répercussions sur la composition phytochimique.

Parallèlement à cela, trois autres aspects scientifiques ont été examinés lors de cette étude, notamment: l'évaluation des aptitudes antioxydantes des extraits de feuilles et de fleurs, provenant de six populations de *P. biloba*; l'étude de l'impact que peut avoir la taille des particules des extraits phénoliques de *P. biloba* sur l'activité antioxydante et en dernier, l'étude de l'emploi des extraits phénoliques de *P. biloba* comme composés d'enrichissement alimentaire (test d'enrichissement alimentaire).

S'agissant des résultats relatifs à la caractérisation en composés phénoliques des extraits de feuilles et de fleurs, nous avons relevé que les populations de *P. biloba* ont montré une variabilité notable, en termes de teneurs, de ses constituants. En effet, allant de $59,99 \pm 1,62$ (fleurs de la population ENK) à $153,46 \pm 1,36$ μg EAG/mg d'extrait (feuilles de la population AHS) bien qu'en flavonoïdes (de $8,09 \pm 0,83$ à $53,84 \pm 0,24$ μg EQ/mg d'extrait) considérés comme le groupe phénolique majoritaire. De manière générale, ce sont les organes de feuilles qui se montrent plus riches en composés phénoliques que les fleurs sur la majorité des populations *Phlomis* étudiées. Les résultats de nombreux travaux menés sur d'autres espèces de *Phlomis* confirment et corroborent avec les nôtres.

La richesse en composés phénoliques des extraits de certaines populations leurs confère un pouvoir antioxydant très puissant. Ces résultats valorisent davantage ses populations qui peuvent être exploitées comme source naturelle alternative aux antioxydants synthétiques, suspects par leur possible toxicité. L'efficacité antioxydante des extraits de feuilles de *Phlomis* a été mise en évidence par d'autres études conduites sur des espèces différentes aux nôtres.

Quant à l'étude de l'impact de la taille des particules contenues dans les extraits de *P. biloba* sur leurs caractéristiques phénoliques et antioxydantes, les résultats nous ont permis de mettre en évidence, le rôle majeur que peuvent jouer les nanoparticules dans les propriétés antioxydantes des extraits aqueux et organiques. Néanmoins les autres particules de tailles supérieures contribuent eux aussi à l'activité antioxydante mais pas autant que les nanoparticules. Ce résultat représente à lui seule une découverte très précieuse que nous avons pu faire lors de cette étude et ouvre de nouvelles pistes dans l'étude des propriétés biologiques des extraits végétaux.

Concernant l'expérience menée sur l'enrichissement alimentaire, les résultats ont montré que le test de déshydratation osmotique (DO) constitue un moyen d'enrichissement très efficace malgré sa simplicité. Ce test a permis de mettre en exergue les bonnes aptitudes de *P. biloba* pour servir, comme source naturelle, à l'enrichissement des aliments en molécules bioactives. Les résultats du test montrent que l'enrichissement a généré un aliment modèle plus riche en composés phénoliques que les fruits et les légumes connus pour leurs richesses en composés phénoliques en alimentation humaine.

Pour ce qui est des expériences conduites pour la caractérisation moléculaire de différentes populations étudiées, les résultats révèlent une diversité génétique importante entre les six populations et montrent que la variation génétique de *P. biloba*, est en partie, modulée par le facteur environnement (situation géographique). En effet, les populations qui étaient proches géographiquement ne présentaient pas beaucoup de variabilité génétique entre elles et vice versa.

La région de Chlef est extrêmement riche en diversité génétique pour l'espèce *P. biloba*. Cette dernière est présente sur tout le territoire couvrant la wilaya à l'exception de la zone du littoral. La plante, en plus de la place importante qu'elle occupe dans la pharmacopée traditionnelle Algérienne, elle peut jouer également d'autres rôles comme source d'enrichissement alimentaire, compte tenu de sa richesse en composés phénoliques.

Pour ce qui est des perspectives d'avenir, il nous paraît essentiel de poursuivre et de compléter la présente étude par d'autres travaux de recherche qui porteront sur d'autres aspects comme:

- Pousser les recherches sur les composés phénoliques contenus dans les extraits de feuilles, de fleurs et d'autres organes (racines, graines, etc.) en procédant à une analyse fine par HPLC ;
- L'élargissement de la zone d'étude pour inclure tout l'Ouest Algérien dans une première étape et pourquoi pas tout le territoire national par la suite;
- L'adoption de programmes d'études scientifiques sur la diversité des plantes médicinales locales pour une meilleure valorisation des ressources phylogénétiques Algériennes;
- La valorisation de *P. biloba* dans l'enrichissement des aliments réels en exploitant le processus de déshydratation osmotique pour vérifier les limites de l'application de cette technologie et pour l'optimiser sur les aliments réels par l'amélioration des conditions expérimentales afin d'épuiser au maximum la solution osmotique;
- La réalisation des enquêtes sur les caractéristiques sensorielles des aliments réels enrichis par *P. biloba* afin de vérifier leurs acceptabilités par le consommateur;
- L'élargissement des études sur les particules notamment les nanoparticules contenues dans les extraits de *P. biloba* (caractéristiques physiques et bioactivité);
- L'utilisation de la technologie de séquençage du génome entier ou partielle pour étudier le polymorphisme dans les populations de *P. biloba*;
- Prévoir une étude portant sur la régénération in vitro des chémotypes intéressants des *Phlomis*;
- Prévoir une étude ethnobotanique sur l'utilisation des *Phlomis*.

Références bibliographiques

1. Aboutabl, E.A., Meselhy, M.R., Afifi, M.S. 2002. Iridoids from *Phlomis aurea* Decne growing in in Egypt. *Pharmazie* 57: 646–647.
2. Adylov, T.A., Kamelin, R.V., Makhmedov, A.M. 1986. Notae de Lamiaceis (Lamiaceae). *Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii* 23: 110–114
3. Akbulut, O., Mace, C.R., Martinez, R.V., Kumar, A.A., Nie, Z., Patton, M.R., Whitesides, G.M. 2012. Separation of Nanoparticles in Aqueous Multiphase Systems through Centrifugation. *Nano Letters* 12: 4060– 4064.
4. Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D.L., Quantick, P.C., Shahidi, F. 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1410–1416.
5. Albaladejo, R.G., Aguilar, J.F., Aparicio, A., Feliner, G.N. 2005. Contrasting nuclear-plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *Phlomis crinita* and *P. lychnitis* lineages (Lamiaceae). *Taxon* 54: 987–998.
6. Albaladejo, R.G., Aparicio, A. 2007. Population genetic structure and hybridization patterns in the Mediterranean endemics *Phlomis lychnitis* and *P. crinita* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 100: 735–746.
7. Albaladejo, R.G., Aparicio, A., Silvestre, S. 2004. Variation patterns in the *Phlomis x composita* (Lamiaceae) hybrid complex in the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of Linnean Society* 145: 97–108.
8. Ali Haimoud, S., Allem, R., Merouane, A. 2016. Antioxidant and anti-inflammatory properties of widely consumed date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Fruit varieties in Algerian oases. *Journal of Food Biochemistry* 40: 463–471.
9. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Kyriakopoulou, I., Mitaku, S., Chinou, I.B. 2004. Essential oils of *Phlomis* species growing in Greece: chemical composition and antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 320–324.
10. Aneta, W., Jan, O., Renata, C. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940–949.
11. Aparicio, A., Albaladejo, R.G., Porras, M., Ceballos, G. 2000. Isozyme evidence for natural hybridization in *Phlomis* (Lamiaceae): Hybrid origin of the rare *P. x margaritae*. *Annals of Botany* 85(1):7–12.
12. APG [Angiosperm Phylogeny Group] II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
13. Azizian, D., Cutler, D.F. 1982. Anatomical, cytological and phytochemical studies on *Phlomis* L. and *Eremostachys* Bunge (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 85: 249–281.

14. Azizian, D., Moore, D.M. 1982. Morphological and palynological studies in *Phlomis* L., *Eremostachys* Bunge and *Paraphlomis* Prain (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 85: 225–248.
15. Bahadori, M.B., Valizadeh, H., Asghari, Dinparast, L., Farimani, M.M., Bahadori, S. 2015. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *Journal of Functional Foods* 18: 727–736.
16. Bajalan, I., Mohammadi, M., Alaei, M., Ghasemi Pirbalouti A. 2016. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of extracts from different populations of lavandin. *Industrial Crops and Products* 87: 255–260.
17. Balandrin M.F., Klocke J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H. 1985. Natural plants chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228(4704): 1154–1160.
18. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1):191–203.
19. Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247–277.
20. Barat, J.M., Fito, P., Chiralt, A. 1998. Equilibrium in cellular food-osmotic solution systems as related to structure. *Journal of Food Science* 63(5): 836–840.
21. Barber, J.C., Finch, C.C., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Jansen, R.K. 2007. Hybridization in Macaronesian *Sideritis* (Lamiaceae): Evidence from incongruence of multiple independent nuclear and chloroplast sequence datasets. *Taxon* 56: 74–88.
22. Barber, J.C., Ortega, J.F., Santos-Guerra, A., Marrero, A., Jansen, R.K. 2000. Evolution of endemic *Sideritis* (Lamiaceae) in Macaronesia: Insights from a chloroplast DNA restriction site analysis. *Systematic Botany* 25: 633–647.
23. Barber, J.C., Ortega, J.F., Santos-Guerra, A., Turner, K.G., Jansen, R.K. 2002. Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence data-sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 293–306.
24. Basta, A., Tzakou, O., Couladis, M. 2006. The essential oil composition of *Phlomis cretica* C. Presl. *Flavour and Fragrance Journal* 21: 795–797.
25. Bchir, B. 2011. Contribution to pomegranate seeds conservation (*Punica granatum* L.) by osmotic dehydration. Thèse de doctorat, Université de Liège, Liège, Belgique, 198p.
26. Ben Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. 2013. Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of by-products of *Salvia verbenaca* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops and Products* 49: 373–379.

27. Benítez, G., González-Tejero, M.R., Molero-Mesa, J. 2010. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology* 129: 87–105.
28. Berger, J. 2003. Enrichissement des aliments en micronutriments: élément d'une stratégie intégrée de lutte contre les carences en micronutriments, en particulier en fer, dans les pays en développement. 2nd International Workshop on Food-based approaches for a healthy nutrition, Ouagadougou, 23-28/11/ 2003.
29. Bollinger, W.H. 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228 :1154 –1160.
30. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.
31. Bourekoua, H., Rózylo, R., Gawlika-Dziki, U., Benatallah, L., Zidoune, M.N., Dziki, D. 2017. Evaluation of physical, sensorial, and antioxidant properties of gluten-free bread enriched with *Moringe oleifera* leaf powder. *European Food Research and Technology* 244:189–195.
32. Brandt, K., Christensen, L.P., Hansen-Møller, J., Hansen, S.L., Haraldsdotter, J., Jesperen, L., Purups, S., Kharazmi, A., Barkholt, V., Frokiaer, H., Kobaek-Larsen, M. 2004. Health promoting compounds in vegetables and fruits. A systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends in Food Science and Technology* 15: 384–393.
33. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 28: 25–30.
34. Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9: 553–557.
35. Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M. 1993. Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested DNA – identification of markers tightly linked to the supernodulation locus in soybean. *Molecular Genetics and Genomics* 241: 57–64.
36. Calis, I., Kirmizibekmez, H. 2004. Glycosides from *Phlomis lunariifolia*. *Phytochemistry* 65: 2619–2625.
37. Calis, I., Kirmizibekmez, H., Ersoz, T., Dönmez, A.A., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R. 2005. Iridoid glucosides from Turkish *Phlomis tuberosa*. *Zeitschrift für Naturforschung* 60(b): 1295–1298.
38. Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. 1996. Antioxidant activity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(11): 3426–3431.

39. Carmona, M.D., Lorach, R., Obon, Rivera, D. 2005. "Zahraa", a Unani multicomponent herbal tea widely consumed in Syria: components of drug mixtures and alleged medicinal properties. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 344–350.
40. Casarin, F. 2012. Otimização do processo de secagem da amora-preta (*Rubus* sp.) para a produção de farinha. These de Master, Université régionale de Chapecó. Publications Msc Environnemental Science, Chapeco.
41. Celik, S., Gokturk, R.S., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. 2005. Essential oils of *Phlomis leucophracta*, *Phlomis chimerae* and *Phlomis grandiflora* var. *grandiflora* from Turkey. *Biochemical and Systematic Ecology* 33: 617–623.
42. Chakraborty, S., Stalin, S., Das, N., Choudhury, S.T., Ghosh, S., Swarnakar, S. 2012. The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and mmp-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat. *Biomaterials* 33: 2991–3001.
43. Charters, Y., Wilkinson, M. 2000. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theoretical and Applied genetic* 100: 160–166.
44. Chun, O.K., Kim, D.O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., Lee, C.Y. 2005. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(10): 1715–1724.
45. Cieslik, E., Gręda, A. and Adamus, W. 2006. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry* 94(1): 135–142.
46. CIN [Conférence Internationale sur la Nutrition]. 1992. Les grands enjeux des stratégies nutritionnelles. FAO/WHO, Rome.
47. Couladis, M., Tanimanidis, A., Tzakou, O., Chinou, L.B., Harvala, C. 2000. Essential oil of *Phlomis lanata* Growing in Greece: Composition and antimicrobial activity. *Planta Medica* 66: 670–672.
48. Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C. 2003. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy Research* 17: 194–195.
49. Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. 2006. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview, In: Crozier, A., Clifford M.N., Ashihara, H. (Eds) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 1-24.
50. Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26: 1001–1043.
51. Crozier, A., Lean, M.E.J., McDonald, M.S., Black, C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 590–595.

52. Daly, D.C., Cameron, K.M., Stevenson, D.W. 2001. Plant Systematics in the Age of Genomics. *Plant Physiology* 127(4): 1328–1333.
53. Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linssen, P.H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 140–146.
54. Das, J., Thapa, S., Pradhan, D., Thorat, S.S. and Talukdar, N.C. 2013. Intra- specific genetic diversity, phytochemical analysis and antioxidant activities of a potential Himalayan *Swertia* (*Swertia bimaculata* Hook. F. and Thomas.). *Industrial Crops and Products* 49: 341–347.
55. Del Rio D, Borges G, Crozier A. 2010. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition* 104(Suppl 3): S67–S90.
56. Delazar, A., Sabzevari, A., Mojarrab, M., Nazemiyeh, H., Esnaashari, S., Nahar, L., Razavi, S.M., Sarker, S.D. 2008. Free-radical-scavenging principles from *Phlomis caucasica*. *Natural Medicine (Tokyo)* 62: 464–466.
57. Dellai, A., Ben Mansour, H., Limem-Ben Amor, I., Bouhleb, I., Ben Sghaier, M., Ghedira, K., Chekir-ghedira, L., 2009. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the flowers of *Phlomis crinita* Cav. ssp *mauritanica* munby from the center of Tunisia. *Drug and Chemical Toxicology* 32(3): 283–292.
58. Delnavazi, M. R., Mohammadifar, F., Rustaie, A., Aghaahmadi, A., Yassa, N. 2016. Phytochemical constituents, antioxidant activity and toxicity potential of *Phlomis olivieri* Benth. *Research Journal of Pharmacognosy* 3(2): 9–15.
59. Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M.Y., Baser, K.H.C. 2008. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control* 19: 1159–1164.
60. Desfontaine, R. 1798. *Flora atlantica, zive historia plantarum, quae in atlante agro Tunetano et Algeriensi crescent, tomus secundus*. Apud editorem L.G. Deagranges, Reipublicae Gallica.
61. Di Maro, A., Pacifico, S., Fiorentino, A., Galasso, S., Gallicchio, M., Guida, V., Severino, V., Monaco, P., Parente, A. 2013. *Raviscanina wild asparagus (Asparagus acutifolius L.): A nutritionally valuable crop with and antiproliferative properties*. *Food Research International* 53: 180–188.
62. Djendoubi, N. 2012. *Etude cinétique et optimisation multicritère du couplage déshydratation imprégnation par immersion: séchage convectif de la poire, la pomme et l'abricot*. Thèse de doctorat, institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement, Paris.
63. Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y-H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(3): 296–302.

64. Drewnowski, A., Gomez-Carneros, C. 2000. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer –A review. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 1424–1435.
65. Dumolin-Lapegue, S., Demesure, B., Fineschi, S., Le Corre, V., Petit, R.J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475–1487.
66. Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M. 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society* 62(3): 599-603.
67. Dwyer, J. 1995. Overview: dietary approaches for reducing cardiovascular disease risks. *Journal of nutrition* 125: 656S–665S.
68. Eliassen, A.H., Hendrickson, S.J, Brinton, L.A., Buring, J.E., Campos, H., Dai, Q., Dorgan J.F., Franke, A., Gao Y-T., Goodman, M.T., Hallmans, G., Helzlsouer, K.J., Hoffman-Bolton, J., Hultén, K., Sesso, H.D., Sowell, A., Tamimi, R.M., Toniolo, P., Ailken, L.R., Winkvist, A., Zeleniuch-Jacque, A., Zheng, W., Hankinson, S.E. 2012. Circulating carotenoids and risk of breast cancer: Pooled analysis of eight prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute* 104: 1905–1916.
69. Elsevier. 2018a. <https://www.sciencedirect.com/search?q=Phenolic%20compounds>: (consulté le 5/3/2018)
70. Elsevier. 2018b. <https://www.sciencedirect.com/search?q=ISSR>: (consulté le 9/9/2018).
71. Erzano, M., Schnell e Schühli, G., Pereira dos Santos, É. 2015. Genetic Variability and Population Structure of *Salvia lachnostachys*: Implications for Breeding and Conservation Programs. *International Journal of Molecular Sciences*: 16: 7839-7850.
72. Ersöz T., Schühly W., Popov S., Handjieva N., Sticher O., Çaliş I. 2001a. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Phlomis longifolia* var. *longifolia*. *Natural Product Letters* 15(5): 345–351
73. Ersöz, T., Alipieva, K.I., Yalc, in, F.N., Akbay, P., Handjieva, N., Dönmez, A.A., Popov, S., Calis, I. 2003. Physocalycoside, a new phenylethanoid glycoside from *Phlomis physocalyx* Hub.-Mor. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 58: 471–476.
74. Ersöz, T., Ivancheva, S., Akbay, P., Sticher, O., Calis, I. 2001b. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Phlomis tuberosa*. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 56: 695–698.
75. Ersöz, T., Saracoglu, I., Harput, U.S., Calis, I., Dönmez, A.A. 2002b. Iridoid, phenylethanoid glycosides from *Phlomis grandifolia* var. *fimbrilligera* and *Phlomis fruticosa*. *Turkish Journal of chemistry* 26: 171–178.
76. Ersöz, T., Saracoglu, I., Tasdemir, D., Kirmizibekmez, H., Dönmez, A.A., Ireland, C.M., Calis, I. 2002a. Neolignan Glucosides from *Phlomis chimerae* Boiss. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 57(3–4): 221–225.

77. Evren, O.H., Yüzbaşıoğlu E., Dadandı M.Y. 2015. Determination of intra-specific genetic variation of *Phlomis kurdica* and *Phlomis oppositiflora* and investigation for the hybridity of *P. x melitenense* (Lamiaceae) by means of molecular markers. *Biologia* 70(9): 1159–1171.
78. FAO/WHO. 1994. *Codex Alimentarius*. 2nd edition. FAO/WHO, Rome.
79. Fernández-Ocaña, A.M, Ortuño-Moya, I., Martos-Gilabert, A.I., Fernández-López, C. 1996. *Saber y utilización de plantas en la provincia de Jaén. Campaña de 1993*.
80. Forkmann, G. 1991. Flavonoids as flower pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering, *Plant Breeding* 106: 1–26.
81. Franklin, E.G. 1970. Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the family Pinaceae. USDA Forest Service Research Paper 61.
82. Georgescu, L., Stefanakis, M.K., Kokkini, S., Katerinopoulos, H.E., Pirintsos S.A. 2016. Chemical and genetic characterization of *Phlomis* species and wild hybrids in Crete. *Phytochemistry* 122: 91–102.
83. Ghasemi Pirbalouti, A., Hashemi, M., Taherian Ghahfarokhi, F. 2013. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 48: 43–48.
84. Ghassemi, N., Sajjadi, S.E., Lame, M.A. 2001. Volatile constituents of *Phlomis olivieri* Benth. *Daru* 7: 48-50.
85. Gopal, J., Muthu, M., Paul, D., Kim, D.-H., Chun, S., 2016. Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. *Scientific Reports* 6: article 19710, DOI: 10.1038/srep19710.
86. Gupta, P.K., Roy, J.K., Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants—A Review. *Current Science* 80(4): 524–535.
87. Gürbüz, I., Üstün, O., Yesilada, E., Sezik, E., Kutsal, O. 2003. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 93–97.
88. Gurcharan, S. 2010. *Plants systematics: an integrated approach*, third edition. Science Publisher Inc., Enfield, New Hampshire.
89. Habtemariam, S., Gray, A.I., Waterman, P.G. 1994. Diterpenes from the leaves of *Leonotis ocyimifolia* var. *raineriana*. *Journal of Natural Products* 57: 1570–1574.
90. Hamrick, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: Schonewald-Cox, C.M., Chambers, S.M., Mc Bryde, B., Thomas, W.L. (Eds.), *Genetics and Conservation*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, pp. 335–348.
91. Hanover, J.W. 1992. Applications of terpene analysis in forest genetics. *New Forests* 6: 159–178.

92. Harborne, J.B. 1993. *Methods in Plant Biochemistry*, vol 1: Plant phenolics. Academic Press, London.
93. Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., de Kok, R., Krestovskaya, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O., Upson, T. 2004. Labiatae. In: Kubitzki, K., Kadereit, J.W. (Eds.), *The families and genera of vascular plants*, vol. 7. Springer, Berlin and Heidelberg, pp. 167–275
94. Harput Ü.Ş., Çalış I., Saracoğlu I., Dönmez A. A., Nagatsu A. 2005. Secondary Metabolites from *Phlomis syriaca* and Their Antioxidant Activities. *Turkish Journal of Chemistry* 30: 383-390.
95. Hedge, I.C. 1986. Labiateae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 89B: 23-35.
96. Hedge, I.C. 1990. Labiateae, In: Ali, S.I., Nassir, Y.J., (Eds), *Flora of Pakistan*. BCC and T Press, University of Karachi, Karachi, pp. 193–217.
97. Hernandez, P., Martin, A., Dorado, G. 1999. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Molecular Breeding* 5(3): 245–253.
98. Hilan, C., Sfeir, R., Jawish, D., Aitour, S. 2006. Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae. *Lebanese Science Journal* 7(2): 13-22.
99. Horikoshi, S., Serpone, N. 2013. Introduction to Nanoparticles. In: Horikoshi, S., Serpone, N. (eds). *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, New York, pp. 1-24.
100. Huber-Morath, A. 1982. *Phlomis L.*, In: Davis, P.H. (Ed). *Flora of Turkey and East Aegean Island*, vol. 7. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 102–126.
101. Ismailoglu, U.B., Saracoglu, I., Harput, U.S., Sahin-Erdemli, I. 2002. Effects of phenylpropanoid and iridoid glycosides on free radical-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings. *Journal Ethnopharmacology* 79: 193–197.
102. Jabeen, B., Riaz, N., Saleem, M., Naveed, M.A., Ashraf, M., Alam, U., Rafiq, H.M., Tareen, R.B., Jabbar, A., 2013. Isolation of natural compounds from *Phlomis stewartii* showing alpha-glucosidase inhibitory activity. *Phytochemistry* 96: 443–448.
103. Jiang, G. 2017. Molecular Markers. In: Thomas, B., Murray, B.G., Murphy, D.J., (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd edition, Volume 2. Academic Press, Massachusetts, pp. 207–214.

104. Jimoh, F.O., Adedapo, A.A., Afolayan, A.J. 2010. Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food Chemistry and Toxicology* 48: 964–971.
105. Kabouche, A., Kabouche, Z., Seguin, E., Tillequin, F., Bruneau, C. 2005. A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 813–816.
106. Kabouche, A., Kabouche, Z., Seguin, E., Tillequin, F., Bruneau, C. 2004. Comparative phytochemical study of the butanolic extracts of two Algerian *Phlomis* species. *Chemistry of Natural Compounds* 40(2): 188–189.
107. Kamelin, R.V., Makhmedov, A.M. 1990a. The system of the genus *Phlomoides* (Lamiaceae). *Botanicheskii Zhurnal (Moscow & Leningrad)* 75: 241–250.
108. Kamelin, R.V., Makhmedov, A.M. 1990b. A new system of the genus *Phlomis* (Lamiaceae). *Botanicheskii Zhurnal (Moscow & Leningrad)* 75: 1163–1167.
109. Karabourniotis, G., Liakopoulos, G., Nikolopoulos, D., Bresta, P., Stavroulaki, V., Sumbele, S. 2014. Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence: two dilemmas with soluble phenolics as a joker. *Plant Science* 227: 21–27.
110. Karron, J.D. 1991. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. In: Falk, D.A., Holsinger, K.E. (Eds.), *Genetic and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, pp. 87–98.
111. Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry* 100(2):584–589.
112. Kchaou W, Abbés F, Attia H et Besbes S. (2014) In vitro antioxidant activities of three selected dates from Tunisia (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Food Chemistry* 8:1–8.
113. Kelen, M., Tepe, B. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99: 4096– 4104.
114. Khafagi, I.K., Dewedar, A. 2000. The efficiency of random versus ethno-directed the evaluation of Sinai medicinal plants for compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 365–376.
115. Khanam, M., Abul Hassan, M.D., 2005. A critical study of the genus *Leucas* R.Br. (Lamiaceae) from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 12: 1–10.
116. Kim, E.Y., Kim, Y.R., Nam, T.J., Kong, I.S. 2012. Antioxidant and DNA protection activities of a glycoprotein isolated from a seaweed, *Saccharina japonica*. *International Journal of Food Science and Technology* 47: 1020–1027.

117. Kim, J-K., Kim, E-H., Lee O-K., Park, S-Y., Lee, B., Kim, S-H., Park, I., Chung, I-M. 2013. Variation and correlation analysis of phenolic compounds in mungbean (*Vigna radiata* L.) varieties. *Food Chemistry* 141: 2988–2997.
118. Kirmizibekmez, H., Calis, I., Perozzo, R., Brun, R., Dönmez, A., Linden, A., Rüedi, P., Tasdemir, D. 2004. Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Medica* 70: 711–717.
119. Kirmizibekmez, H., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Dönmez, A., Çalış, I. 2005. Identification by HPLC-PAD-MS and quantification by HPLC-PAD of phenylethanoid glycosides of five *Phlomis* species. *Phytochemistry Analysis* 16: 1–6.
120. Kivrak, I., Duru, M.E., Ozturk, M., Mercan, N., Harmandar, M., Topçu, G. 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry* 116: 470–479.
121. Kowalczyk, B., Lagzi, I. 2011. Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16: 135–148.
122. Kumar, R., Bhan, S., Kalla, A.K., Dhar, K.L., 1992. 28-noroleana-16, 21-diene triterpens from *Phlomis spectabilis*. *Phytochemistry* 31(8): 2797–2799.
123. Kyriakopoulou, I., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Aligianis, N., Harvala, C. 2001. Samioside, a new phenylpropanoid glycoside with free radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. *Journal of Natural Product* 64: 1095–1097.
124. Laikre, L., Allendorf, F.W., Aroner, L.C., Baker, C.S., Gregovich, D.P., Hansen, M.M., Jackson, J.A., Kendall, K.C., McKelvey, K., Neel, M.C., Olivieri, I., Ryman, N., Schwartz, M.K., Bull, R.S., Stetz, J.B., Tallmon, D.A., Taylor, B.L., Vojta, C.D., Waller, D.M., Waples, R.S. 2009. Neglect of genetic diversity in implementation of the conservation on biological diversity. *Conservation Biology* 24:86–88
125. Lamien-Meda, A., Nell, M., Lohwasser, U., Börner, A., Franz, C., Novak, J. 2010. Investigation of antioxidant and rosmarinic acid variation in the sage collection of the genebank in Gatersleben. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3813–3819.
126. Law, W., Salick, J. 2007. Comparing conservation priorities for useful plants among botanists and Tibetan doctors. *Biodiversity Conservation* 16: 1747–1759.
127. Li, M.X., Shang, X.F., Jia, Z.P. and Zhang, R.X. 2010. Phytochemical and biological studies of plants from the genus *Phlomis*. *Chemistry and Biodiversity* 7:283–301.
128. Li, X-W., Hedge, I.C. 1994. Lamiaceae Lindley (唇形科 chun xing ke): part 30 *Phlomis* Linnaeus, Sp. Pl. 2: 584. 1753 (糙苏属 cao su shu). In: Zhengyi, W., Raven, P.H., Deyuan, H. (Eds.) *Flora of China*, Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden, St. Louis, vol. 17, pp: 143–155. (available from: <http://www.efloras.org>).

129. Lihsi, W., Hedge, I.C. 1994. Lamiaceae (唇形科 chun xing ke). Flora of China 17: 50–299.
130. Limem, I., Harizi, H., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. .2011. Leaf extracts from *Phlomis crinita* Cav. subs. *mauritanica* Munby affect immune cell functions in vitro. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 33(2): 309–314.
131. Limem-Ben Amor I., Boubaker J., Ben Sgaier M., Skandrani I., Bhourri W., Neffati A., Kilani S., Bouhlel I., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. 2009a. Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species –A review. *Journal of Ethnopharmacology* 125: 183–202
132. Limem-Ben Amor, I., Neffati, A., Ben Sgaier, M., Bhourri, W., Boubaker, J., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ben Ammar, R., Chraief, I., Hammami, M., Ghoul, Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. 2008. Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from *Phlomis crinita* Cav. ssp. *mauritanica* Munby. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 845–849.
133. Limem-Ben Amor, I., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sgaier, M., Neffati, A., Bhourri, W., Bouhlel, I., Chouchane, N., Kilani, S., Guedon, E., Ghoul, M., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2009b. Investigation of biological activity of polar extracts isolated from *Phlomis crinita* Cav ssp. *mauritanica* Munby. *Drug and Chemical Toxicology* 32(1): 38–46.
134. Lin, J.K., Weng, M.S. 2006. Flavonoids as Nutraceuticals. In: Grotewold E (ed.) *The Science of Flavonoids*, Springer, New York, pp. 213–238.
135. Lindqvist, C., Albert, V.A. 2002. Origin of the Hawaiian endemic mints within the North American *Stachys* (Lamiaceae). *American Journal of Botany* 89: 1709–1724.
136. Lindqvist, C., Motley, T.J., Jeffrey, J.J., Albert, V.A. 2003. Cladogenesis and reticulation in the Hawaiian endemic mints (Lamiaceae). *Cladistics* 19: 480–495.
137. Liolios, C., Laouer, H., Boulaacheb, N., Gortzi, O., Chinou, I. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noé subsp. *Bovei*. *Molecules* 12: 772–781.
138. Liu, G-D., Chen, G-L., Li, W., Li, C.X. 2013. Genetic and phytochemical diversities of *Cynomorium songaricum* Rupr. in Northwest China indicated by ISSR markers and HPLC-fingerprinting. *Biochemical Systematics and Ecology* 48: 34–41.
139. Liu, P., Takaishi, Y., Duan, H.Q. 2007. Two new phenylethanoid glycosides from the roots of *Phlomis umbrosa*. *Chinese Chemistry Letters* 18: 155–157.
140. López, V., Akerreta, S., Casanova, E., García-Mina, J.M., Caverro, R.Y., Calvo, M.I. 2007. In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts. *Plant Foods for Human Nutrition* 62: 151–155.
141. López, V., Jäger, A.K., Akerreta, S., Yolanda Caverro, R., Calvo, I.M. 2010. Antioxidant Activity and Phenylpropanoids of *Phlomis lychnitis* L.: A Traditional Herbal Tea. *Plant Foods for Human Nutrition* 65:179–185.

142. Luque, C. L., Legal, H., Staudter, C. G., Wink, W. 2002. ISSR (inter simple sequence repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas* 136: 251–225.
143. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
144. Makhmedov, A.M. 1990. Systema Generis Eremostachys Bunge (Lamiaceae). *Novosti Sistematiiki Vysshikh Rastenii* 27: 135–137.
145. Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P. Becker, K. 2007. Plant Secondary Metabolites. Humana Press, New Jersey.
146. Manandhar, S. 2002. Plants and People of Nepal. Timber Press, Catmando.
147. Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A., Ferreira, D. 2006. The stereochemistry of flavonoids, In: Grotewold, E., (Ed), *The Science of Flavonoids*. Springer Science & Business Media, Inc., New York, pp. 1-46.
148. Marin, P.D., Grayer, R.J., Grujic-Jovanovic, S., Kite, G.C., Veitch, N.C. 2004. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry* 65: 1247–1253.
149. Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids In bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40(3): 255-260.
150. Mathiesen, C., Scheen, A.-C., Lindqvist, C. 2011. Phylogeny and biogeography of the lamioid genus *Phlomis* (Lamiaceae). *Kew Bulletin* 66: 83–99.
151. Mc Dougall, G.J. 2016. Phenolic-enriched foods: sources and processing for enhanced health benefits. *Proceedings of the Nutrition Society: Nutrition Society Scottish Section Meeting. The Royal College of Physicians, Edinburgh on 21–22/3/2016*: 1–9.
152. Medjahed, F., Merouane, A., Saadi, A., Bader, A., Luigi Cioni, P., Flamini, G. 2016. Chemical profile and antifungal potential of essential oils from leaves and flowers of *Salvia algeriensis* (Desf.): A comparative study. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(2): 195–200.
153. Merouane, A., Saadi, A., Noui, A. 2018. Impact of removal of micro and Nano sized particles on the phenolic content and antioxidant activity: Study on aqueous and methanolic leaves extracts of *Phlomis crinita*. *Industrial Crops and Products* 114: 132–136.
154. Mirza, M., Nik, Z.B. 2003. Volatile constituents of *Phlomis olivieri* Benth from Iran. *Flavour and Fragrance Journal* 18: 131-132.
155. Moein, S., Farzami, B., Khaghani, S., Moein, M.R., Larijani, B. 2007. Antioxidant properties and prevention of cell cytotoxicity of *Phlomis persica* Boiss. *Daru* 15(2): 83–88.

156. Mohajer, M., Sarkhail, P., Hajarolasvadi, N., Zamani, M.J., Khorasani, R., Shafiee, A., Amin, G., Abdollahi, M. 2005. Antiinflammatory and analgesic effects of *Phlomis laceolata* Boiss. and Hohen. extracts and examination of their components. *International Journal of Pharmacology* 2: 50–54.
157. Mohamed, S.K., Khaled, M.M., Hashim, A.H., Kazuhiro, O., Ryoji, K., Kazuo, Y. 2000. Iridoid and megastigmane glycosides from *Phlomis aurea*. *Phytochemistry* 55: 353–357.
158. Mohler, V., Schwarz, G. 2005. Genotyping Tools in Plant Breeding: From Restriction Fragment Length Polymorphisms to Single Nucleotide Polymorphisms In: Lörz, H., Wenzel, G. (eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 55. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 23–38.
159. Mokkaedem, A. 1999. Cause de Dégradation des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. *Vie et Nature* 7: 24–26.
160. Morand, C., Milenkovic, D. 2014. Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfique des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovation agronomiques* 42: 47–62.
161. Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E., Avato, P. 2010. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial Crops and Products* 32: 639–649.
162. Morteza-Semnani, K. , Azadbakht, M. and Goodarzi, A. 2004. The essential oils composition of *Phlomis herba-venti* L. leaves and flowers of Iranian origin. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 29-31.
163. Mujica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Lopez-Malo, A., Palou, E., Welte-Chanes, J. 2003. Impregnation and osmotic dehydration of some fruits: effect of the vacuum pressure and syrup concentration. *Journal of Food Engineering* 57: 305–314.
164. Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4): 56–65.
165. Najimi, B., El Jaafari, S., Jlibène, M., Jacquemin, J-M. 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement* 1: 17–35.
166. Naranjo, P. 1995. Urgent need for the study of medicinal plants, in: Schultes, R., Von Reis, S., (Eds) *Ethnobotany: Evolution of a Discipline*. Dioscorides Press, Portland, OR, pp. 362–368.
167. Nazemiyeh, H., Rahman, M.M., Gibbons, S., Nahar, L., Delazar, A., Ghahramani, M.A., Talebpour, H., Sarker, S.D. 2008. Assessment of the antibacterial activity of phenylethanoid glycosides from *Phlomis lanceolata* against multiple-drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Natural Medicine (Tokyo)* 62: 91–95.

168. NCCPG [National Council for the Conservation of Plants and Gardens]. 2018. Phlomis Distribution by Country, <http://www.nccpg.com>: (consulté le 4/2/2018).
169. Ng, W.L., Tan, S.G. 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?. *ASM Science Journal* 9(1): 30–39.
170. Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S., Pinto-Gomes, C. 2004. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 93: 183–195.
171. Oliveira, A.P., Baptista, P., Andrade, P.B., Martins, F., Pereira, J.A. Silva, B.M., Valentão, P. 2012. Characterization of *Ficus carica* L. cultivars by DNA and secondary metabolite analysis: Is genetic diversity reflected in the chemical composition?. *Food Research International* 49: 710–719.
172. Olson, M., Hood, L., Cantor, C., Botstein, D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434–1435.
173. Organisation mondiale de la Santé (OMS). 2003. Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Genève, 96 p.
174. Ostrander, E.A., Jong, P.M, Rine, J., Duyk, G. 1992. Construction of small insert genomic libraries highly enriched for micro satellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 3419–3423.
175. Pan, Y.Z., Fang, L.Q., Hao, G., Cai, J., Gong, X. 2009. Systematic positions of *Lamiophlomis* and *Paraphlomis* (Lamiaceae) based on nuclear and chloroplast sequences. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 535–542.
176. Paran, I., Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and applied genetics* 85: 985–993.
177. Paredes-Lopez, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Perez, M., Hernandez-Perez, T., 2010. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life – A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 65: 299–308.
178. Peng, L., Ru, M., Wang, B., Wang, Y., Li, B., Yu J., Liang, Z. 2014. Genetic diversity assessment of a germplasm collection of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 55: 84–92.
179. Phoon, K.Y., Ng H.S., Zakaria, R., Yim H.S., Noriznan Mokhtar, M. 2018. Enrichment of minor components from crude palm oil and palm-pressed mesocarp fibre oil via sequential adsorption-desorption strategy. *Industrial Crops and Products* 113: 187–195.
180. Poczai, P., Varga, I., Neil, E.B., Hyvonen, J. 2012. Genomics Meets Biodiversity: Advances in Molecular Marker Development and Their Applications in Plant Genetic Diversity Assessment. In: Caliskan, M., (Ed.), *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity* (ISBN: 978-

- 953-51-0157-4), InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-molecular-basis-of-plant-genetic-diversity/genomics-meets-biodiversity-advances-in-molecular-marker-development-and-their-applications-in-plant>
181. Pool, H., Quintanar, D., Figueroa, J.D.D., Marinho Mano, C., Bechara, J.E.H., Godinez, L.A., Mendoza, S. 2012. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials* 2012: Article ID 145380.
182. Prieto, P., Pineda, M., Aguila, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269(21): 337–341.
183. Pub-Med. 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Phenolic>: (consulté le 5/3/2018).
184. Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions Désertiques et Méridionales, Tome II. Editions CNRS, Paris.
185. Rafalski, J.A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics– A Review. *Current Opinion in Plant Biology* 5(2): 94–100.
186. Ranawana, V., Campbell, F., Bestwick, C., Nicol, P., Milne, L., Duthie, G., Raikos, V. 2016. Breads fortified with freeze-dried vegetables: quality and nutritional attributes. Part II: breads containing oil as an ingredient. *Foods* 5: 19–29.
187. Raoult-Wack, A.L. 1994. Recent advances in the osmotic dehydration of foods. *Food Science and Technology* 5: 255-260.
188. Rausher, M.D. 2006. The evolution of flavonoids and their genes. In: Grotewold, E. (ed.) *The Science of Flavonoids*, Springer, New York, pp. 175-211.
189. Rebecca, S., Lanigan and Torill A. Yamarik. 2002. Final Report on the Safety Assessment of BHT1 *International Journal of Toxicology* 21(Suppl. 2): 19–94.
190. Recuenco, M.C., Lacsamana, M.S., Hurtada, W.A., Sabularse, V.C. 2016. Total Phenolic and Total Flavonoid Contents of Selected Fruits in the Philippines 145 (3): 275-281.
191. Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.
192. Ristic, M.D., Duleti-Laujevi, S., Kneevi-Vukevi, J., Marin, P.D., Simi, D., Vukojevi, J., Janakovi, P., Vajs, V. 2000. Antimicrobial activity of essential oils and ethanol extract of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research* 14: 267–271.
193. Rodolfo, J., Koroch, A., Simon, J., Hitimana, N. 2006. Quality of geranium oils: case studies in southern and eastern Africa. *Journal of essential oil research* 18: 116–121.

194. Rózek, A., Achaerandio, I., Pilar Almajano, M., Güell, C., López, F., Ferrando, M. 2007. Solid Foodstuff Supplemented with Phenolics from Grape: Antioxidant Properties and Correlation with Phenolic Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5147–5155.
195. Ryan, K.G., Swinny, E.E., Winefield, C., Markham, K.R. 2001. Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 56: 745–754.
196. Ryding, O. 1998. Phylogeny of the *Leucas* group (Lamiaceae). *Systematic Botany* 13: 637–646.
197. Ryding, O. 2003. Reconsideration of *Wiedemannia* and notes on the circumscription of *Lamium* (Lamiaceae). *Botanische Jahrbücher für Systematik* 124: 325–335.
198. Ryding, O. 2008. Pericarp structure and phylogeny of the *Phlomis* group (Lamiaceae subfam. Lamioideae). *Botanische Jahrbücher für Systematik* 127: 299–316.
199. Saafi, E.B., El arem, A., Issaoui, M., Hammami, M., Achour, L. 2009. Phenolic content and antioxidant activity of four date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit varieties grown in Tunisia. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 2314–2319.
200. Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
201. Saracoglu, I., Harput, U. S., Calis, I. 2002. Phenolic Constituents from *Phlomis lycia*. *Turkish Journal of Chemistry* 26: 133–142.
202. Saracoglu, I., Inoue, M., Calis, I., Ogihara, Y. 1995. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. *Biological and Pharmaceutical Bulltein* 18: 1396–1400.
203. Sarawong, C., Schoenlechner, R., Sekiguchi, K., Berghofer, E., Ng, P.K.W. 2014. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and anti-oxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry* 143: 33–39.
204. Sarikurkcu, C., Ozer, M.S., Cakir, A., Eskici, M., Mete, E. 2013. GC/MS Evaluation and In Vitro Antioxidant Activity of Essential Oil and Solvent Extracts of an Endemic Plant Used as Folk Remedy in Turkey: *Phlomis bourgaei* Boiss. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: article ID 293080.
205. Sarikurkcu, C., Uren, M.C., Tepe, B., Cengiz, M. and Kocak, M.S. 2015. *Phlomis armeniaca*: Phenolic compounds, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products* 78: 95–101.
206. Sarikurkcu, C., Uren, M.C., Tepe, B., Cengiz, M. and Kocak, M.S. 2014. Phenolic content: enzyme inhibitory and antioxidative activity potentials of *Phlomis nissolii* and *P. pungens* var. *pungens*. *Industrial Crops and Products* 62: 333–340.

207. Sarkhail, P., Abdollahi, M., Fadayeveatan, S., Shafiee, A., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Esmaily, H., Amin, G. 2010. Effect of *Phlomis persica* on glucose levels and hepatic enzymatic antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Magazine* 6: 219–224.
208. Sarkhail, P., Amin, G., Salehi Surmaghi, M.H., Shafiee, A. 2005. Composition of the volatile oils of *Phlomis lanceolata* Boiss. & Hohen., *Phlomis anisodonta* Boiss. and *Phlomis bruguieri* Desf. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 327–329.
209. Sarkhail, P., Rahmanipour, S., Fadyevatan, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Amin, G., Shafiee, A., Abdollahi, M., 2007. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmaceutical Research* 56: 261–266.
210. Scheen, A.-C., Lindqvist C., Fossdal, C.G., Albert V.A. 2008. Molecular phylogenetics of tribe Synandreae, a North American lineage of lamioid mints (Lamiaceae). *Cladistics* 24: 299–238.
211. Scheen, A-C., Albert V.A. 2009. Molecular phylogenetics of the Leucas group (Lamioideae: Lamiaceae). *Systematic Botany* 34: 173–181.
212. Scheen, A-C., Bendiksby, M., Ryding, O., Mathiesen, C., Albert V.A., Lindqvist, C. 2010. Molecular phylogenetics, character evolution and suprageneric classification of Lamioideae (Lamiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 191–219.
213. Shahidi, F., Naczk, M. 1995. Antioxidant properties of food phenolics. In: Shahidi, F., Naczk, M. (eds.), *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing Co., Pennsylvania, pp. 235–277.
214. Shin, T.Y., Kim, S.H., Kim, D.K., Leem, K.H., Park, J.S. 2008. Effect of *Phlomis umbrosa* root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. *Phytotherapy Research* 22: 153–158.
215. Shin, T.Y., Lee, J.K. 2003. Effect of *Phlomis umbrosa* root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 25(1): 73–85.
216. Singh Gill, S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909–930.
217. Singh, B.D., Singh, A.K. 2015. *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices*. Springer, New Delhi.
218. Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, vol. 299. Academic Press, San Diego, CA.
219. Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M., Wianowska, D., Maksymiec, W., Dawidowicz, A. L., Tukiendorf, A. 2004. The influence of heavy metal stress on the level of some flavonols in the primary leaves of *Phaseolus coccineus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 26: 247–254.

220. So, F.V., Guthrie, A.F., Chambers, A.F., Moussa, M., Carroll, K.K. 1996. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer* 26: 167–181.
221. Soković, M.D., Marin, P.D., Janackovic, P., Vajs V., Milosavljevic, S., Dokovic, D., Tesevic, V., Petrovic, S. 2002. Composition of the essential oils of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research* 14:167–168.
222. Soković, M.D., Marin, P.D., Simić, D., Kenžević-Vukčević, J., Vajas, V., Petrović, S. 2002. Antimutagenic activity of essential oil and crude extract of *Phlomis fruticosa*. *Pharmaceutical Biology* 40: 311–314.
223. Someya, S., Yoshiki, Y., Okubo, K. 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry* 79:351–354.
224. Song, J.Y., Luo, H.M., Li, C.F., Sun, C., Xu, J., Chen, S.L. 2013. *Salvia miltiorrhiza* as medicinal model plant. *Yao Xue Xue Bao* 48(7):1099–1106. (article en chinois).
225. Stankovic M.S., Zia-UI-Haq, M., Bojovic, B.M., topuzovic, M.D. 2014. Total phenolics, flavonoid content and antioxidant power of leaf, flower and fruits from cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 20(2): 358–363.
226. Steichen, S.D., Caldorera-Moore, M., Peppas, N.A. 2013. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48: 416–427.
227. Strauss, S.H., Critchfield, W.B. 1982. Inheritance of p-pinene in xylem oleoresin of Knobcone x Monterey pine hybrids. *Forest Science* 28: 687–696.
228. Takeda, Y., Isai, N., Masuda, T., Honda, J., Takaishi, Y., Ito, M., Otsuka, H., Ashurmetov, A.O., Khodzhimatov, K.O. 2001. *Phlomis flavosides* A and B, new flavonol bisglycosides from *Phlomis spinidens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49: 1039–1041.
229. Takeda, Y., Kinugawa, M., Masuda, T., Honda, G., Otsuka, H., Sezik, E., Yesilad, E. 1999. *Phlomisethanoside*, a phenylethanoid glycoside from *Phlomis grandiflora* var. *grandiflora*. *Phytochemistry* 51: 323–325.
230. Takeda, Y., Matsumur, H., Masud, T., Honda, G., Otsuka, H., Takaishi, Y., Sezik, E., Yesilada, E. 2000. *Phlorigidosides* A–C, iridoid glucosides from *Phlomis rigida*. *Phytochemistry* 53: 931–935.
231. Tasdemir, D., Brun, R., Perozzo, R., Dönmez, A.A. 2005. Evaluation of antiprotozoal and plasmodial enoyl-ACP reductase inhibition potential of Turkish medicinal plants. *Phytotherapy Research* 19: 162–166.
232. Taylor, L. P., Grotewold, E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 317–323.

233. Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E. and Sarikurkcu, C. 2011. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia* 82: 237–246
234. Thangaraj, P. 2016. *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*, volume 71. Springer, Switzerland.
235. Thorne, R.F. 2007. An updated classification of the class Magnoliopsida (“Angiospermae”). *The Botanical Review* 73(2):67–181.
236. Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F. 1992. Flavonoid p-coumaroylglucosides and 8-hydroxyflavone allosylglucosides in some Labiatae. *Phytochemistry* 31: 3097–3102.
237. Trindade, H. 2010. Molecular biology of aromatic plants and spices-A review-. *Flavour and Fragrance Journal* 25: 272–281.
238. Tsitsimi E., Loukis A., Verykokidou E. 2000. Composition of the essential oil of the flowers of *Phlomis fruticosa* L. from Greece. *Journal of Essential Oil Research* 12: 355–356.
239. US [Department of Agriculture, Agricultural Research Service]. 2004. USDA Database on the Procyanidin Content of Selected Foods. Nutrient Data Laboratory (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/PA/PA.html>): (consulté le 9/9/2018).
240. USDA [United States Department of Agriculture]. 2018. <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PHAU12>: (consulté le 9/9/2018).
241. Uysal, A., Gunes, E., Sarikurkcu, C., Celik, H., Durak, Y., Uren M.C. 2016. New Prospective Materials for Chemoprevention: Three *Phlomis*. *British Journal of Pharmaceutical Research* 10(3): 1-13.
242. Venskutonis, P.R. 2004. Food additives: the dilemma of “synthetic or natural”. *Acta Alimentaria* 33: 1–5.
243. Vermerris, W., Nicholson, R. 2008. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, New York.
244. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407–4414.
245. Wagstaff, S.J., Hickerson, L., Spangler, R., Reeves, P.A., Olmstead, RG. 1998. Phylogeny in Labiatae s.l., inferred from cpDNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* 209: 265–274.
246. Walter, S.J., Christopher, S.C., Elizabeth, A.K., Peter, S. 2002. *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*, édition traduite. De Boeck Universirty, Paris.

247. Wang, G.F., Shi, L.P., Ren, Y.D., Liu, Q.F., Liu, H.F., Zhang, R.J., Li, Z., Zhu, F.H., He, P.L., Tang, W., Tao, P.Z., Li, C., Zhao, W.M., Zuo, J.P. 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral Research* 83: 186–190.
248. Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(3): 701–705.
249. Ward, S.M., Gaskin, J.F., Wilson, L.M. 2008. Ecological genetics of plant invasions: what do we know? *Invasive Plant Science and Management* 1: 98–109.
250. Weber, J.L. and May, P. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388–396.
251. Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213–7218.
252. Wheeler, N.C., Jech, K.S. 1992. The use of electrophoretic markers in seed orchard research. *New Forests* 6: 311–328.
253. White, T.L., Adams, W.T., Neale, D.B. 2007. *Forest genetics*. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK / Cambridge, MA, USA.
254. WHO. 1998. *Medicinal plants in the republic of Korea: information on 150 commonly used medicinal plants*. Series/Report. WHO regional publications. Western Pacific series no.21, Manila.
255. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
256. Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64(1): 3–19.
257. Wink, M., Sauer-Gurth H., Gwinner, E. 2002. A molecular phylogeny of stonechats and related turdids inferred from mitochondrial DNA sequences and genomic fingerprinting by ISSR-PCR. *British Birds* 95: 349–355
258. World Bank. 1994. *Enriching lives: overcoming vitamin and mineral malnutrition in developing countries: development in practice*. World Bank, Washington, DC.
259. Wu, T.H., Yen, F.L., Lin, L.T., Tsai, T.R., Lin, C.C., Cham, T.M. 2008. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 346: 160–168.
260. Xu, Z., Ji, A., Zhang, X., Song, J., and Chen, S. 2016. Biosynthesis and regulation of active constituents in medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza*. *Chinese Herbal Medicines* 8: 3–11.

261. Yalçın, F.N., Ersoz, T., Akbay, P., Calıs, I., Dçnmez, A.A., Sticher, O. 2003. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Phlomis samia*, *P. monocephala* and *P. carica*. *Turkish journal of chemistry* 27(3): 295-305
262. Yüzbaşıođlu, E. Dadandi, M.Y. 2008. Phylogenetic relationships among species of the subsection *Dendrophlomis* Benth. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(4): article 7.
263. Yüzbaşıođlu, E., Dadandi, M.Y., Ozcan, S. 2008. Natural hybridization between *Phlomis lycia* D. Don. x *P. bourgaei* Boiss. (Lamiaceae) revealed by RAPD markers. *Genetica* 133(1): 13–20.
264. Zhang, Y. and Wang, Z.Z. 2009. Phenolic composition and antioxidant activities of two *Phlomis* species: a correlation study. *Comptes Rendus Biologies* 332(9): 816–826.
265. Zhang, Y., Wong, Z.Z. 2008. Comparative analysis of essential oil components of three *Phlomis* species in Qinling Mountains of China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47: 213–217.

Annexe 1: Récapitulation de l'enrichissement alimentaire

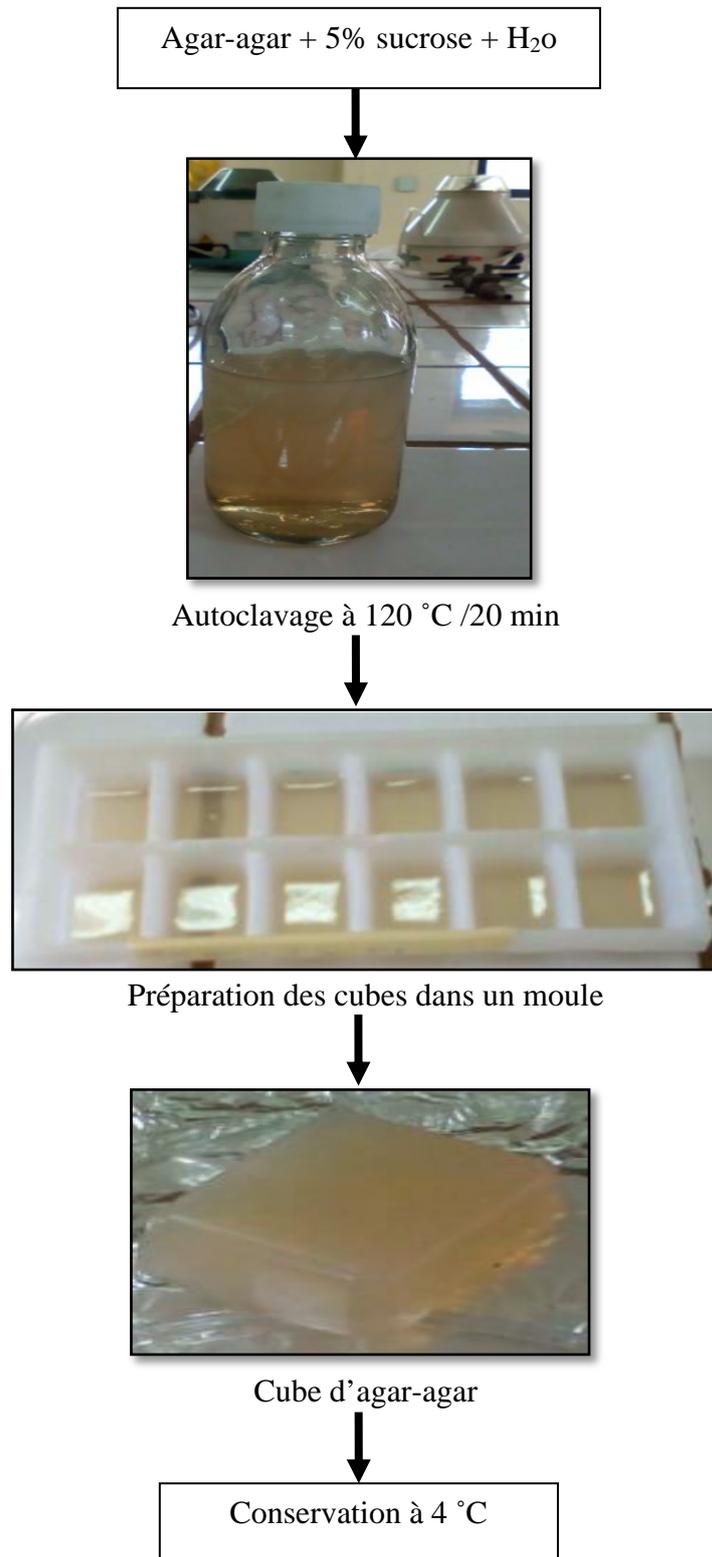
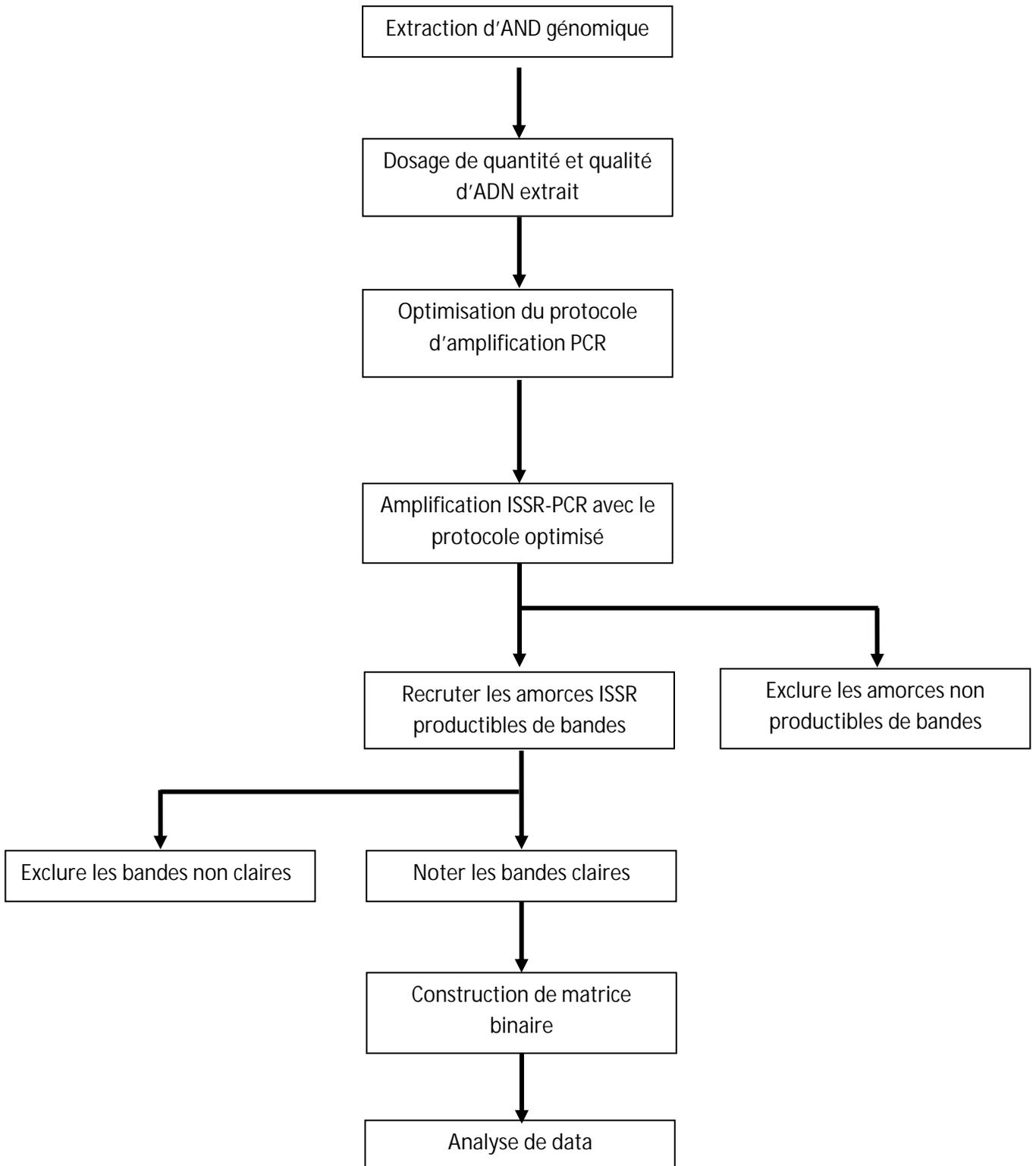


Figure 1: Préparation d'aliment modèle

Annexe 2: Protocole récapitulatif de l'étude de diversité génétique par la technique ISSR/PCR



Annexe 3: Préparation des tampons

3-1-Tampon TBE 5X (Tris Borique EDTA à 5X)

Tris-base.....	54g
Acide borique.....	27.5g
EDTA.....	200mL (0.5M, pH8)
H ₂ O stérile.....	QSP 1000mL

3-2-Préparation de 0.5M EDTA

Na-EDTA.....	46.5g
NaOH pour régler le pH a 8	
H ₂ O stérile.....	500 mL

3-3-Tampon TBE 0,5X

Prélevé 10mL de Tampon TBE 5X complété à 100mL avec l'eau distillée

3-4-Gel d'agarose 0,8%

Agarose	1.2g
Tampon TBE 0,5X (pH 8)	100 mL

3-5-Tampon de charge

Na- EDTA (500 mM).....	2 mL
Bleu de bromophénol (2%).....	0.75 mL
Glycérol (100%)	5 mL
Xylène cyanole (2%).....	0.75 mL
H ₂ O.....	1.5 mL

Annexe 4: Tableaux de l'analyse statistique**Tableau 1: ANOVA de la teneur des populations en composés phénoliques**

Part	(I) Population	(J) Population	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Feuilles	sidi Amer	abou El hassen	-65,93667*	1,16377	,000
		Taougrite	9,30333*	1,16377	,000
		Medjadja	-25,38667*	1,16377	,000
		El nakhla	-16,81000*	1,16377	,000
		Ouled benabdelkader	-30,43667*	1,16377	,000
	abou El hassen	sidi Amer	65,93667*	1,16377	,000
		Taougrite	75,24000*	1,16377	,000
		Medjadja	40,55000*	1,16377	,000
		El nakhla	49,12667*	1,16377	,000
		Ouled benabdelkader	35,50000*	1,16377	,000
	Taougrite	sidi Amer	-9,30333*	1,16377	,000
		abou El hassen	-75,24000*	1,16377	,000
		Medjadja	-34,69000*	1,16377	,000
		El nakhla	-26,11333*	1,16377	,000
		Ouled benabdelkader	-39,74000*	1,16377	,000
	Medjadja	sidi Amer	25,38667*	1,16377	,000
		abou El hassen	-40,55000*	1,16377	,000
		Taougrite	34,69000*	1,16377	,000
		El nakhla	8,57667*	1,16377	,000
		Ouled benabdelkader	-5,05000*	1,16377	,010
El nakhla	sidi Amer	16,81000*	1,16377	,000	
	abou El hassen	-49,12667*	1,16377	,000	
	Taougrite	26,11333*	1,16377	,000	
	Medjadja	-8,57667*	1,16377	,000	
	Ouled benabdelkader	-13,62667*	1,16377	,000	
Ouled benabdelkader	sidi Amer	30,43667*	1,16377	,000	
	abou El hassen	-35,50000*	1,16377	,000	
	Taougrite	39,74000*	1,16377	,000	
	Medjadja	5,05000*	1,16377	,010	
	El nakhla	13,62667*	1,16377	,000	
Fleurs	sidi Amer	abou El hassen	9,34333*	1,45048	,000
		Taougrite	12,67333*	1,45048	,000
		Medjadja	22,00000*	1,45048	,000

Les annexes

	El nakhla	30,67667 [*]	1,45048	,000
	Ouled benabdelkader	4,00667	1,45048	,133
abou El hassen	sidi Amer	-9,34333 [*]	1,45048	,000
	Taougrite	3,33000	1,45048	,267
	Medjadja	12,65667 [*]	1,45048	,000
	El nakhla	21,33333 [*]	1,45048	,000
	Ouled benabdelkader	-5,33667 [*]	1,45048	,029
Taougrite	sidi Amer	-12,67333 [*]	1,45048	,000
	abou El hassen	-3,33000	1,45048	,267
	Medjadja	9,32667 [*]	1,45048	,000
	El nakhla	18,00333 [*]	1,45048	,000
	Ouled benabdelkader	-8,66667 [*]	1,45048	,001
Medjadja	sidi Amer	-22,00000 [*]	1,45048	,000
	abou El hassen	-12,65667 [*]	1,45048	,000
	Taougrite	-9,32667 [*]	1,45048	,000
	El nakhla	8,67667 [*]	1,45048	,001
	Ouled benabdelkader	-17,99333 [*]	1,45048	,000
El nakhla	sidi Amer	-30,67667 [*]	1,45048	,000
	abou El hassen	-21,33333 [*]	1,45048	,000
	Taougrite	-18,00333 [*]	1,45048	,000
	Medjadja	-8,67667 [*]	1,45048	,001
	Ouled benabdelkader	-26,67000 [*]	1,45048	,000
Ouled benabdelkader	sidi Amer	-4,00667	1,45048	,133
	abou El hassen	5,33667 [*]	1,45048	,029
	Taougrite	8,66667 [*]	1,45048	,001
	Medjadja	17,99333 [*]	1,45048	,000
	El nakhla	26,67000 [*]	1,45048	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level (Tukey test).

Tableau 2: ANOVA de la teneur des populations en flavonoïdes

Part	(I) Population	(J) Population	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Feuilles	sidi Amer	abou El hassen	-32,22667*	,60436	,000
		Taougrite	-6,37667*	,60436	,000
		Medjadja	-21,10000*	,60436	,000
		El nakhla	-11,15667*	,60436	,000
		Ouled benabdelkader	-16,54000*	,60436	,000
	abou El hassen	sidi Amer	32,22667*	,60436	,000
		Taougrite	25,85000*	,60436	,000
		Medjadja	11,12667*	,60436	,000
		El nakhla	21,07000*	,60436	,000
		Ouled benabdelkader	15,68667*	,60436	,000
	Taougrite	sidi Amer	6,37667*	,60436	,000
		abou El hassen	-25,85000*	,60436	,000
		Medjadja	-14,72333*	,60436	,000
		El nakhla	-4,78000*	,60436	,000
		Ouled benabdelkader	-10,16333*	,60436	,000
	Medjadja	sidi Amer	21,10000*	,60436	,000
		abou El hassen	-11,12667*	,60436	,000
		Taougrite	14,72333*	,60436	,000
		El nakhla	9,94333*	,60436	,000
		Ouled benabdelkader	4,56000*	,60436	,000
	El nakhla	sidi Amer	11,15667*	,60436	,000
		abou El hassen	-21,07000*	,60436	,000
		Taougrite	4,78000*	,60436	,000
		Medjadja	-9,94333*	,60436	,000
		Ouled benabdelkader	-5,38333*	,60436	,000
Ouled benabdelkader	sidi Amer	16,54000*	,60436	,000	
	abou El hassen	-15,68667*	,60436	,000	
	Taougrite	10,16333*	,60436	,000	
	Medjadja	-4,56000*	,60436	,000	
	El nakhla	5,38333*	,60436	,000	

Les annexes

Fleurs	sidi Amer	abou El hassen	-3,96000*	,39452	,000
		Taougrite	-3,80333*	,39452	,000
		Medjadja	-4,95333*	,39452	,000
		El nakhla	2,80333*	,39452	,000
		Ouled benabdelkader	-2,99667*	,39452	,000
abou El hassen	sidi Amer	abou El hassen	3,96000*	,39452	,000
		Taougrite	,15667	,39452	,998
		Medjadja	-,99333	,39452	,193
		El nakhla	6,76333*	,39452	,000
		Ouled benabdelkader	,96333	,39452	,216
Taougrite	sidi Amer	abou El hassen	3,80333*	,39452	,000
		abou El hassen	-,15667	,39452	,998
		Medjadja	-1,15000	,39452	,104
		El nakhla	6,60667*	,39452	,000
		Ouled benabdelkader	,80667	,39452	,374
Medjadja	sidi Amer	abou El hassen	4,95333*	,39452	,000
		abou El hassen	,99333	,39452	,193
		Taougrite	1,15000	,39452	,104
		El nakhla	7,75667*	,39452	,000
		Ouled benabdelkader	1,95667*	,39452	,003
El nakhla	sidi Amer	abou El hassen	-2,80333*	,39452	,000
		abou El hassen	-6,76333*	,39452	,000
		Taougrite	-6,60667*	,39452	,000
		Medjadja	-7,75667*	,39452	,000
		Ouled benabdelkader	-5,80000*	,39452	,000
Ouled benabdelkader	sidi Amer	abou El hassen	2,99667*	,39452	,000
		abou El hassen	-,96333	,39452	,216
		Taougrite	-,80667	,39452	,374
		Medjadja	-1,95667*	,39452	,003
		El nakhla	5,80000*	,39452	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level (Tukey test).

Tableau 3: ANOVA de la teneur des populations en flavonols

Part	(I) Population	(J) Population	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Feuilles	sidi Amer	abou El hassen	,07000	,45902	1,000
		Taougrite	-,38000	,45902	,956
		Medjadja	,06333	,45902	1,000
		El nakhla	-2,55000 [*]	,45902	,001
		Ouled benabdelkader	-4,01333 [*]	,45902	,000
	abou El hassen	sidi Amer	-,07000	,45902	1,000
		Taougrite	-,45000	,45902	,916
		Medjadja	-,00667	,45902	1,000
		El nakhla	-2,62000 [*]	,45902	,001
		Ouled benabdelkader	-4,08333 [*]	,45902	,000
	Taougrite	sidi Amer	,38000	,45902	,956
		abou El hassen	,45000	,45902	,916
		Medjadja	,44333	,45902	,920
		El nakhla	-2,17000 [*]	,45902	,005
		Ouled benabdelkader	-3,63333 [*]	,45902	,000
	Medjadja	sidi Amer	-,06333	,45902	1,000
		abou El hassen	,00667	,45902	1,000
		Taougrite	-,44333	,45902	,920
		El nakhla	-2,61333 [*]	,45902	,001
		Ouled benabdelkader	-4,07667 [*]	,45902	,000
El nakhla	sidi Amer	2,55000 [*]	,45902	,001	
	abou El hassen	2,62000 [*]	,45902	,001	
	Taougrite	2,17000 [*]	,45902	,005	
	Medjadja	2,61333 [*]	,45902	,001	
	Ouled benabdelkader	-1,46333	,45902	,066	
Ouled benabdelkader	sidi Amer	4,01333 [*]	,45902	,000	
	abou El hassen	4,08333 [*]	,45902	,000	
	Taougrite	3,63333 [*]	,45902	,000	
	Medjadja	4,07667 [*]	,45902	,000	
	El nakhla	1,46333	,45902	,066	
Fleurs	sidi Amer	abou El hassen	-3,53333 [*]	,53217	,000
		Taougrite	-1,62333	,53217	,083
		Medjadja	4,11667 [*]	,53217	,000
		El nakhla	4,24333 [*]	,53217	,000
		Ouled benabdelkader	1,12000	,53217	,346

Les annexes

abou El hassen	sidi Amer	3,53333 [*]	,53217	,000
	Taougrite	1,91000 [*]	,53217	,034
	Medjadja	7,65000 [*]	,53217	,000
	El nakhla	7,77667 [*]	,53217	,000
	Ouled benabdelkader	4,65333 [*]	,53217	,000
Taougrite	sidi Amer	1,62333	,53217	,083
	abou El hassen	-1,91000 [*]	,53217	,034
	Medjadja	5,74000 [*]	,53217	,000
	El nakhla	5,86667 [*]	,53217	,000
	Ouled benabdelkader	2,74333 [*]	,53217	,003
Medjadja	sidi Amer	-4,11667 [*]	,53217	,000
	abou El hassen	-7,65000 [*]	,53217	,000
	Taougrite	-5,74000 [*]	,53217	,000
	El nakhla	,12667	,53217	1,000
	Ouled benabdelkader	-2,99667 [*]	,53217	,001
El nakhla	sidi Amer	-4,24333 [*]	,53217	,000
	abou El hassen	-7,77667 [*]	,53217	,000
	Taougrite	-5,86667 [*]	,53217	,000
	Medjadja	-,12667	,53217	1,000
	Ouled benabdelkader	-3,12333 [*]	,53217	,001
Ouled benabdelkader	sidi Amer	-1,12000	,53217	,346
	abou El hassen	-4,65333 [*]	,53217	,000
	Taougrite	-2,74333 [*]	,53217	,003
	Medjadja	2,99667 [*]	,53217	,001
	El nakhla	3,12333 [*]	,53217	,001

*. The mean difference is significant at the 0.05 level (Tukey test).

Tableau 4: ANOVA de l'activité antioxydante par le test du blanchissement β -carotène

Part	(I) Population	(J) Population	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
	BHT	alpha tocopherol	2,68000	1,22399	,152
		Ascorbic acid	5,54333 [*]	1,22399	,009
	alpha tocopherol	BHT	-2,68000	1,22399	,152
		Ascorbic acid	2,86333	1,22399	,125
	Ascorbic acid	BHT	-5,54333 [*]	1,22399	,009
		alpha tocopherol	-2,86333	1,22399	,125
Feuilles	sidi Amer	abou El hassen	-5,16000 [*]	1,00088	,003
		Taougrite	24,73667 [*]	1,00088	,000
		Medjadja	13,96333 [*]	1,00088	,000
		El nakhla	2,40000	1,00088	,231
		Ouled benabdelkader	6,38000 [*]	1,00088	,000
	abou El hassen	sidi Amer	5,16000 [*]	1,00088	,003
		Taougrite	29,89667 [*]	1,00088	,000
		Medjadja	19,12333 [*]	1,00088	,000
		El nakhla	7,56000 [*]	1,00088	,000
		Ouled benabdelkader	11,54000 [*]	1,00088	,000
	Taougrite	sidi Amer	-24,73667 [*]	1,00088	,000
		abou El hassen	-29,89667 [*]	1,00088	,000
		Medjadja	-10,77333 [*]	1,00088	,000
		El nakhla	-22,33667 [*]	1,00088	,000
		Ouled benabdelkader	-18,35667 [*]	1,00088	,000
	Medjadja	sidi Amer	-13,96333 [*]	1,00088	,000
		abou El hassen	-19,12333 [*]	1,00088	,000
		Taougrite	10,77333 [*]	1,00088	,000
		El nakhla	-11,56333 [*]	1,00088	,000
		Ouled benabdelkader	-7,58333 [*]	1,00088	,000
	El nakhla	sidi Amer	-2,40000	1,00088	,231
		abou El hassen	-7,56000 [*]	1,00088	,000
		Taougrite	22,33667 [*]	1,00088	,000
		Medjadja	11,56333 [*]	1,00088	,000
		Ouled benabdelkader	3,98000 [*]	1,00088	,018
	Ouled benabdelkader	sidi Amer	-6,38000 [*]	1,00088	,000
		abou El hassen	-11,54000 [*]	1,00088	,000
		Taougrite	18,35667 [*]	1,00088	,000
		Medjadja	7,58333 [*]	1,00088	,000
		El nakhla	-3,98000 [*]	1,00088	,018

Les annexes

Fleurs	sidi Amer	abou El hassen	-5,00000 [*]	,56474	,000
		Taougrite	-8,25000 [*]	,56474	,000
		Medjadja	-6,36667 [*]	,56474	,000
		El nakhla	-8,20333 [*]	,56474	,000
		Ouled benabdelkader	5,47000 [*]	,56474	,000
abou El hassen	sidi Amer	abou El hassen	5,00000 [*]	,56474	,000
		Taougrite	-3,25000 [*]	,56474	,001
		Medjadja	-1,36667	,56474	,223
		El nakhla	-3,20333 [*]	,56474	,001
		Ouled benabdelkader	10,47000 [*]	,56474	,000
Taougrite	sidi Amer	abou El hassen	8,25000 [*]	,56474	,000
		abou El hassen	3,25000 [*]	,56474	,001
		Medjadja	1,88333	,56474	,052
		El nakhla	,04667	,56474	1,000
		Ouled benabdelkader	13,72000 [*]	,56474	,000
Medjadja	sidi Amer	abou El hassen	6,36667 [*]	,56474	,000
		abou El hassen	1,36667	,56474	,223
		Taougrite	-1,88333	,56474	,052
		El nakhla	-1,83667	,56474	,060
		Ouled benabdelkader	11,83667 [*]	,56474	,000
El nakhla	sidi Amer	abou El hassen	8,20333 [*]	,56474	,000
		abou El hassen	3,20333 [*]	,56474	,001
		Taougrite	-,04667	,56474	1,000
		Medjadja	1,83667	,56474	,060
		Ouled benabdelkader	13,67333 [*]	,56474	,000
Ouled benabdelkader	sidi Amer	abou El hassen	-5,47000 [*]	,56474	,000
		abou El hassen	-10,47000 [*]	,56474	,000
		Taougrite	-13,72000 [*]	,56474	,000
		Medjadja	-11,83667 [*]	,56474	,000
		El nakhla	-13,67333 [*]	,56474	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level (Tukey test).

Tableau 5: ANOVA de l'activité antioxydante par le test DPPH

Part	(I) Population	(J) Population	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
	BHT	alpha tocopherol	10,52333 ⁺	,06469	,000
		Ascorbic acid	14,13000 ⁺	,06469	,000
	alpha tocopherol	BHT	-10,52333 ⁺	,06469	,000
		Ascorbic acid	3,60667 ⁺	,06469	,000
	Ascorbic acid	BHT	-14,13000 ⁺	,06469	,000
		alpha tocopherol	-3,60667 ⁺	,06469	,000
Feuilles	sidi Amer	abou El hassen	85,19000 ⁺	1,12227	,000
		Taougrite	7,50667 ⁺	1,12227	,000
		Medjadja	49,42667 ⁺	1,12227	,000
		El nakhla	35,89333 ⁺	1,12227	,000
		Ouled benabdelkader	59,16333 ⁺	1,12227	,000
	abou El hassen	sidi Amer	-85,19000 ⁺	1,12227	,000
		Taougrite	-77,68333 ⁺	1,12227	,000
		Medjadja	-35,76333 ⁺	1,12227	,000
		El nakhla	-49,29667 ⁺	1,12227	,000
		Ouled benabdelkader	-26,02667 ⁺	1,12227	,000
	Taougrite	sidi Amer	-7,50667 ⁺	1,12227	,000
		abou El hassen	77,68333 ⁺	1,12227	,000
		Medjadja	41,92000 ⁺	1,12227	,000
		El nakhla	28,38667 ⁺	1,12227	,000
		Ouled benabdelkader	51,65667 ⁺	1,12227	,000
	Medjadja	sidi Amer	-49,42667 ⁺	1,12227	,000
		abou El hassen	35,76333 ⁺	1,12227	,000
		Taougrite	-41,92000 ⁺	1,12227	,000
		El nakhla	-13,53333 ⁺	1,12227	,000
		Ouled benabdelkader	9,73667 ⁺	1,12227	,000
El nakhla	sidi Amer	-35,89333 ⁺	1,12227	,000	
	abou El hassen	49,29667 ⁺	1,12227	,000	
	Taougrite	-28,38667 ⁺	1,12227	,000	
	Medjadja	13,53333 ⁺	1,12227	,000	
	Ouled benabdelkader	23,27000 ⁺	1,12227	,000	
Ouled benabdelkader	sidi Amer	-59,16333 ⁺	1,12227	,000	
	abou El hassen	26,02667 ⁺	1,12227	,000	
	Taougrite	-51,65667 ⁺	1,12227	,000	
	Medjadja	-9,73667 ⁺	1,12227	,000	
	El nakhla	-23,27000 ⁺	1,12227	,000	

Les annexes

Fleurs	sidi Amer	abou El hassen	-3,59000 [*]	,97461	,029
		Taougrite	-39,20667 [*]	,97461	,000
		Medjadja	-42,14667 [*]	,97461	,000
		El nakhla	-49,15667 [*]	,97461	,000
		Ouled benabdelkader	-145,49000 [*]	,97461	,000
abou El hassen	sidi Amer		3,59000 [*]	,97461	,029
		Taougrite	-35,61667 [*]	,97461	,000
		Medjadja	-38,55667 [*]	,97461	,000
		El nakhla	-45,56667 [*]	,97461	,000
		Ouled benabdelkader	-141,90000 [*]	,97461	,000
Taougrite	sidi Amer		39,20667 [*]	,97461	,000
		abou El hassen	35,61667 [*]	,97461	,000
		Medjadja	-2,94000	,97461	,088
		El nakhla	-9,95000 [*]	,97461	,000
		Ouled benabdelkader	-106,28333 [*]	,97461	,000
Medjadja	sidi Amer		42,14667 [*]	,97461	,000
		abou El hassen	38,55667 [*]	,97461	,000
		Taougrite	2,94000	,97461	,088
		El nakhla	-7,01000 [*]	,97461	,000
		Ouled benabdelkader	-103,34333 [*]	,97461	,000
El nakhla	sidi Amer		49,15667 [*]	,97461	,000
		abou El hassen	45,56667 [*]	,97461	,000
		Taougrite	9,95000 [*]	,97461	,000
		Medjadja	7,01000 [*]	,97461	,000
		Ouled benabdelkader	-96,33333 [*]	,97461	,000
Ouled benabdelkader	sidi Amer		145,49000 [*]	,97461	,000
		abou El hassen	141,90000 [*]	,97461	,000
		Taougrite	106,28333 [*]	,97461	,000
		Medjadja	103,34333 [*]	,97461	,000
		El nakhla	96,33333 [*]	,97461	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tableau 6: ANOVA des teneurs en molécules bioactives de l'aliment modèle enrichi

Dependent Variable	(I) Food extract	(J) Food extract	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Total phenolic compounds	Extract 4h	Extract 8h	41,66667	72,67938	,937
		Extract 12h	-101,66667	72,67938	,534
		Extract 24h	-319,16667 [*]	72,67938	,010
	Extract 8h	Extract 4h	-41,66667	72,67938	,937
		Extract 12h	-143,33333	72,67938	,274
		Extract 24h	-360,83333 [*]	72,67938	,005
	Extract 12h	Extract 4h	101,66667	72,67938	,534
		Extract 8h	143,33333	72,67938	,274
		Extract 24h	-217,50000	72,67938	,067
	Extract 24h	Extract 4h	319,16667 [*]	72,67938	,010
		Extract 8h	360,83333 [*]	72,67938	,005
		Extract 12h	217,50000	72,67938	,067
Total flavonoid compounds	Extract 4h	Extract 8h	242,50000 [*]	40,82483	,002
		Extract 12h	167,50000 [*]	40,82483	,015
		Extract 24h	215,00000 [*]	40,82483	,003
	Extract 8h	Extract 4h	-242,50000 [*]	40,82483	,002
		Extract 12h	-75,00000	40,82483	,325
		Extract 24h	-27,50000	40,82483	,904
	Extract 12h	Extract 4h	-167,50000 [*]	40,82483	,015
		Extract 8h	75,00000	40,82483	,325
		Extract 24h	47,50000	40,82483	,664
	Extract 24h	Extract 4h	-215,00000 [*]	40,82483	,003
		Extract 8h	27,50000	40,82483	,904
		Extract 12h	-47,50000	40,82483	,664

*. The mean difference is significant at the 0.05 level (Tukey test).

Tableau 7: ANOVA de l'activité antioxydante (blanchissement beta-carotène) de l'aliment modèle enrichi

(I) Food extract	(J) Food extract	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Extract 4h	Extract 8h	-5,63333 [*]	1,59970	,035
	Extract 12h	-2,04667	1,59970	,709
	Extract 24h	-5,63333 [*]	1,59970	,035
	BHT	-8,64000 [*]	1,59970	,002
Extract 8h	Extract 4h	5,63333 [*]	1,59970	,035
	Extract 12h	3,58667	1,59970	,240
	Extract 24h	,00000	1,59970	1,000
	BHT	-3,00667	1,59970	,385
Extract 12h	Extract 4h	2,04667	1,59970	,709
	Extract 8h	-3,58667	1,59970	,240
	Extract 24h	-3,58667	1,59970	,240
	BHT	-6,59333 [*]	1,59970	,014
Extract 24h	Extract 4h	5,63333 [*]	1,59970	,035
	Extract 8h	,00000	1,59970	1,000
	Extract 12h	3,58667	1,59970	,240
	BHT	-3,00667	1,59970	,385
BHT	Extract 4h	8,64000 [*]	1,59970	,002
	Extract 8h	3,00667	1,59970	,385
	Extract 12h	6,59333 [*]	1,59970	,014
	Extract 24h	3,00667	1,59970	,385

*. The mean difference is significant at the 0.05 level (Tukey test).

Annexe 5: Valorisation des travaux de la thèse

Publications internationales

- **Merouane Abdelaziz**, Saadi Abdelkader, Noui Abdallah. 2018. Impact of removal of micro and nano sized particles on the phenolic content and antioxidant activity: Study on aqueous and methanolic leaves extracts of *Phlomis crinita*. *Industrial Crops and Products* 114:132-136. **(Original article)**
- **Merouane Abdelaziz**, Saadi Abdelkader, Noui Abdallah, Ammar Bader. 2018. Evaluation of phenolic contents and antioxidant properties of the leaves and flowers of *Phlomis biloba* Desf. *International Food Research Journal* 26(1): 167-173. **(Original article)**

Communication internationale

- 16-18 Novembre 2017: **Merouane, A.** Saadi. A. – Importance of micro and nano sized particles in hydromethanolic and aqueous extracts of *Phlomis crinita*: effect on antioxidant activity. International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy (ICPP-2017). Barcelone, Espagne.

Communication nationale

- 25 Avril 2018 : **Merouane. A**, Noui. A, Saadi. A. – Genetic diversity of *Phlomis crinita* from Chlef province (Algeria) assessed by ISSR markers. Troisième colloque national sur la biodiversité en Algérie. Université Larbi Ben M'hidi d'Oum El Bouaghi, Algérie.

Evaluation of phenolic contents and antioxidant properties of the leaves and flowers of *Phlomis biloba* Desf.

^{1,2*}Merouane, A., ²Saadi, A., ^{1,2}Noui, A. and ³Bader, A.

¹Laboratory of Natural Bio-Resources, Hassiba Benbouali University, Chlef 02000, Algeria.

²Faculty of Life and Natural Sciences, Hassiba Benbouali University, Chlef 02000, Algeria.

³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Umm Al-Qura University, Makkah, 21955, Saudi Arabia.

Article history

Received: 30 April, 2017

Received in revised form:

14 February, 2018

Accepted: 2 July, 2018

Keywords

Phlomis biloba

Natural antioxidants

Flavonoids

Functional foods

Abstract

The present work was undertaken to evaluate the antioxidant potentials (β -carotene-linoleic acid system and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, free radical scavenging assay) and bioactive components of leaves and flowers of *Phlomis biloba* Desf. Results show that the leaf extract yielded higher total phenolics ($153.46 \pm 1.36 \mu\text{g GAE/mg extract}$) and flavonoid contents ($53.84 \pm 0.24 \mu\text{g QE/mg extract}$) as compared to the flower extract which yielded $81.33 \pm 2.29 \mu\text{g GAE/mg extract}$ and $14.86 \pm 0.21 \mu\text{g QE/mg extract}$, respectively. However, the flower extract surpassed the leaf extract in flavonol content (06.22 ± 0.05 vs. $03.39 \pm 0.06 \mu\text{g RE/mg extract}$). The leaf extract had the strongest antioxidant potential as evaluated by DPPH ($47.78 \pm 1.12 \text{ mg/mL}$) and β -carotene bleaching assays ($76.18 \pm 0.98\%$) with high correlation to flavonoid contents. The present work introduced *P. biloba* as a potential bio-resource for antioxidants which can be further utilised in food applications.

© All Rights Reserved

Introduction

The species belonging to *Lamiaceae* family have been used since antiquity for both medicinal and culinary purposes especially as spices and herbal tea. Most of their genera have been announced as precious sources of various bioactive compounds (Trivellini *et al.*, 2016). The genus *Phlomis* L. is one of their valuable genera which includes over 100 perennial herbs, shrubs and sub-shrubs species, with distribution's zone starting from the Mediterranean zone to Central Asia and China (Sarikurkcu *et al.*, 2015).

As mentioned by Dioscorides in "*De Materia Medica*", *Phlomis* species were used as folk remedies for respiratory tract disorders or wound healing since ancient civilisations (Couladis *et al.*, 2000). Some *Phlomis* species were regarded as antitussive, tonic, sedative, carminative, astringent agents, and can also be recommended in the treatment of gastrointestinal complications (Sarkhail *et al.*, 2010) as well as prophylactics against liver, kidney, bone and cardiovascular diseases (Jabeen *et al.*, 2013).

Numerous *in vitro* investigations have demonstrated the curative properties that *Phlomis* extracts could offer through diverse bioactivities

such as antibacterial (Couladis *et al.*, 2000; Limem-Ben Amor *et al.*, 2008; Dellai *et al.*, 2009; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009), antimutagenic (Uysal *et al.*, 2016), antiulcerogenic (Gürbüz *et al.*, 2003; Dellai *et al.*, 2009; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009), antigenotoxicity (Dellai *et al.*, 2009; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009), antioxidant (Dellai *et al.*, 2009; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009; Sarikurkcu *et al.*, 2015), immunosuppressive and anti-inflammatory (Algieri *et al.*, 2013). These favourable effects are accredited to a mixture of bioactive components such as phenylpropanoids, irridoids, diterpenoids, phenylethanoids, alkaloids (Kumar *et al.*, 1992) and flavonoids (Kumar *et al.*, 1992; Kabouche *et al.*, 2005).

Phlomis biloba Desf. (synonym *P. crinita*) is characterised by a golden yellow corolla of flowers with opposite, ovate and tomentose leaves (Bentham, 1832). This plant is widely used as a traditional remedy and drink infusion by the local communities. Previous studies have investigated the phytochemical screening and biological activities of many *Phlomis* species. However, very few reports mentioned the *P. biloba* (Limem-Ben Amor *et al.*, 2008; Dellai *et al.*, 2009; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009). Furthermore, there are no published data available on phenolic

*Corresponding author.

Email: merouanaziz@yahoo.com, a.merouane@univ-chlef.dz

amounts, flavonol contents and detailed antioxidant features of this species.

The aim of the present work was therefore to evaluate the total phenolic, flavonoid and flavonol contents as well as the antioxidant properties of *P. biloba* between leaf and flower extracts so as to unravel their potencies as functional food.

Materials and methods

Chemicals

HPLC-grade methanol was purchased from VWR International (Leuven, Belgium). HPLC-grade chloroform, anhydrous sodium carbonate, aluminium chloride, sodium acetate, gallic acid, quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, α -tocopherol, β -carotene and linoleic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Folin-Ciocalteu's phenol reagent and butylated hydroxyl toluene (BHT) were purchased from Sigma Chemical Co. (USA). Ascorbic acid was purchased from Biochem Chemopharma (France).

Plant materials

Aerial parts (leaves and flowers) of *P. biloba* were harvested during the flowering season in May 2016 from Abou El-Hassen region (36°25'25" N, 01°11'39" E) located in the north central part of Chlef province, Algeria. Leaves and flowers were separately dried under shade at room temperature, and finely powdered.

Preparation of extracts

The extraction was performed according to Das *et al.* (2013). Briefly, 500 mg *P. biloba* leaf and flower powder were separately macerated in 80% methanol at room temperature under continuous shaking (WIS-10, Daihan Scientific Co. Ltd., Korea) for 24 h. The extracts were filtered with Whatman No. 1 filter paper, and the residue was rinsed twice with 10 mL 80% methanol, and pooled with the initial filtrate. The filtrate was then concentrated using rotary vacuum evaporator (Büchi, Switzerland) at 40°C, followed by dry freezing at -20°C (Christ Alpha 1-4 LD plus, Germany) to obtain crude extract which was kept at 4°C until further investigation.

Assay for total phenolics

The total phenolic content (TPC) was determined by the spectrophotometric method given by Singleton *et al.* (1999), involving Folin-Ciocalteu reagent and gallic acid as standard with slight modifications. The reaction mixture was prepared by mixing 0.1 mL extract (2 mg/mL) and 2.5 mL 10% Folin-Ciocalteu's

reagent in water. After 10 min, 2.5 mL 7.5% NaHCO₃ was added. The mixture was incubated in the dark at room temperature for 45 min, and the absorbance was read at 765 nm using UV-Vis spectrophotometer (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) against blank. All tests were carried out in triplicate. The TPC was calculated from the standard calibration curve constructed with various concentrations of gallic acid, and expressed as μ g GAE/mg extract.

Assay for total flavonoids

The determination of total flavonoid content (TFC) was based on the method described by Tepe *et al.* (2011) with slight modifications. Briefly, 0.5 mL extract (2 mg/mL) was mixed with 1 mL 2% aluminium chloride (AlCl₃) dissolved in 0.5 mL methanol. The mixture was allowed to stand for 1 h in the dark at room temperature, and measured spectrophotometrically (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) at 420 nm against blank. The same protocol was followed for the standard solution of quercetin, and the calibration line was constructed. All tests were done in triplicate. The TFC was calculated from the standard calibration curve and expressed as μ g QE/mg extract.

Assay for total flavonols

The determination of total flavonols (TFOLC) in hydromethanolic extracts of *P. biloba* was performed following the method described by Ali Haimoud *et al.* (2016). The mixture consisted of 0.2 mL extract (2 mg/mL), 0.5 mL 2% AlCl₃ dissolved in methanol, 0.5 mL sodium acetate (50 g/L) and 0.3 mL methanol. The absorbance of samples and blank was read by UV-Vis spectrophotometer (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) at 440 nm following incubation for 2.5 h at 20°C. The experiment was performed in triplicate. The TFOLC was calculated from the standard calibration curve constructed with various concentrations of rutin, and expressed as μ g RE/mg extract.

DPPH free radical scavenging assay

The ability of *P. biloba*'s extracts and several standard compounds (ascorbic acid, α -tocopherol and BHT) to quench free radicals was measured from the bleaching of purple colour of DPPH solution. The DPPH assay was conducted according to Muid *et al.* (2013). Briefly, 0.5 mL extract at various concentrations (20-160 μ g/mL) was added to 1 mL methanolic DPPH solution prepared at 0.1 mM. The mixture was homogenised and incubated in the dark at room temperature for 30 min. The same procedure was repeated for ascorbic acid, α -tocopherol and

BHT. UV-Vis readings were performed using a spectrophotometer (Optizen 2120) at 517 nm. The inhibition of DPPH free radicals in percent (I%) was calculated using the following equation:

$$I(\%) = \left(\frac{A_0 - A_s}{A_0} \right) \times 100$$

where A_0 was the absorbance of the DPPH solution without extract and A_s was the absorbance of the test sample. The antioxidant activity was expressed in term of IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) defined as the concentration of test sample which reduced the initial DPPH concentration by 50%. All samples were prepared in three independent experiments.

β -Carotene/linoleic acid assay

In this test, the antioxidant activity was evaluated by indirectly measuring the inhibition of volatile organic compounds and conjugated diene hydroperoxides resulting from linoleic acid oxidation (Merouane et al., 2014). Briefly, 1 mL β -carotene solution in chloroform (0.5 mg/mL) was mixed with 25 μL linoleic acid and 200 mg Tween 20. After complete evaporation of the chloroform using a vacuum evaporator at 40°C, 50 mL distilled water (aerated with oxygen for 1 h) was added with vigorous shaking. Next, 2.5 mL of this emulsion was dispersed in test tubes, and 350 μL extracts/standards prepared at 2 g/L was added. The mixture was incubated in the dark at room temperature for 72 h. UV-Vis readings were performed against blank (consisting of 350 μL methanol in 2.5 mL distilled water) using a spectrophotometer (Optizen 2120) at 490 nm. The total antioxidant activity was expressed in term of percentage inhibition relative to the control BHT calculated using the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = (A_s/A_c) \times 100$$

where A_s was the absorbance of test sample after incubation period, and A_c was the absorbance of control BHT at the moment of preparation ($t = 0$).

Statistical analysis

All results were presented as mean value \pm standard deviation of three repetitions. The data were subjected to Analysis of Variance (ANOVA) and statistical significance between mean values was assessed by Tukey's test at 95% confidence level. Pearson's correlation coefficients were calculated to reveal the relationship between antioxidant activity and phytochemical contents. Calculations and Figures were accomplished using statistical package for the social sciences 16.0 software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results and discussion

Aqueous-methanolic extract yields

The yield of aqueous-methanolic (hydromethanolic) extracts from flowers and leaves of *P. biloba* on dry basis were 25.46% and 20.82% (w/w), respectively. These findings are higher than extraction with pure methanol (9.1% for flowers (Dellai et al., 2009) and 8.12% for leaves (Limem-Ben Amor et al., 2009). Aqueous-methanol solvent has in fact been shown to be able to dissolve majority compounds (Do et al., 2014).

Total phenolic contents

The determination of concentrations and biological activities of polyphenols in medicinal plants helps to better elucidate their potencies as functional foods and/or therapeutic agents. It is well known that most of therapeutic applications of these plants are attributed to the phenolic compounds and their different classes that are considered as primary factor against various diseases related to reactive oxygen species (ROS) (Zhang and Wang, 2009). Hence, TPC, TFC and TFOLC were determined in the hydromethanolic extracts of *P. biloba* leaves and flowers, and the results are shown in Figure 1. As seen from Figure 1, the TPC values of leaf extract was significantly ($p < 0.05$) higher ($153.46 \pm 1.36 \mu\text{g GAE/mg}$) as compared to flower extract ($81.33 \pm 2.29 \mu\text{g GAE/mg}$). Although different plant parts have shown different values of TPC, the leaves usually yield the highest (Mahdi-Pour et al., 2012). In comparison to other members of this genus, the methanolic and water extracts of *P. armeniaca* yielded 55.22 ± 1.95 and $54.39 \pm 2.77 \mu\text{g GAE/mg}$, respectively (Sarikurkcu et al., 2015). In another study, *P. nissolii* yielded $50.83 \pm 1.11 \mu\text{g GAE/mg}$ for methanolic extract and $50.90 \pm 0.47 \mu\text{g GAE/mg}$ in water extract, while *P. pungens* var. *pungens* yielded 41.10 ± 2.69 and $57.68 \pm 1.52 \mu\text{g GAE/mg}$ in methanolic and water extracts, respectively (Sarikurkcu et al., 2014). It has been mentioned in previous investigations that chlorogenic, rosmarinic and benzoic acids are the main phenolic compounds in *Phlomis* species (Zhang and Wang, 2009; Sarikurkcu et al., 2014; Sarikurkcu et al., 2015). These species showed remarkable variability in term of TPC. The present work revealed the TPC of *P. biloba* with clear variation between leaves and flowers. The phenolic compounds naturally contained in plants are the most researched natural components (Cheynier et al., 2013). Several studies have investigated their impact on human health and stated that intake of phenolics-rich foods might help in the prevention of various

illnesses such as diabetes, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases and cancers as well as symptoms related to aging and menopause (Vauzour *et al.*, 2010).

Total flavonoid contents

The TFC results are also shown in Figure 1. It is apparent that TFC exhibited similar trend to TPC in which the leaf extract yielded higher TFC ($53.84 \pm 0.24 \mu\text{g QE/mg}$) as compared to the flower extract ($14.86 \pm 0.21 \mu\text{g QE/mg}$). Previous studies conducted on methanolic extracts obtained from leaves (Limem-Ben Amor *et al.*, 2009) and flowers (Dellai *et al.*, 2009) have shown the presence of flavonoids in *P. biloba*. Kabouche *et al.* (2005) have also isolated four flavonoids from aerial parts of this species. According to the literature, the qualitative chemical investigation of *Phlomis* species reported that glycosylated apigenin, luteolin, naringenin, eriodictyol and chryseriol are the most frequently found flavonoids (Zhang and Wang, 2009; Li *et al.*, 2010; Sarikurkcu *et al.*, 2015). The importance of flavonoids in foods and herbal extracts appears in their protective effects against a variety of diseases related to ROS through their capacity to transfer free radical electrons, chelate metal catalysts, activate antioxidant enzymes, reduce α -tocopherol radicals and inhibit oxidation (Lin and Weng, 2006).

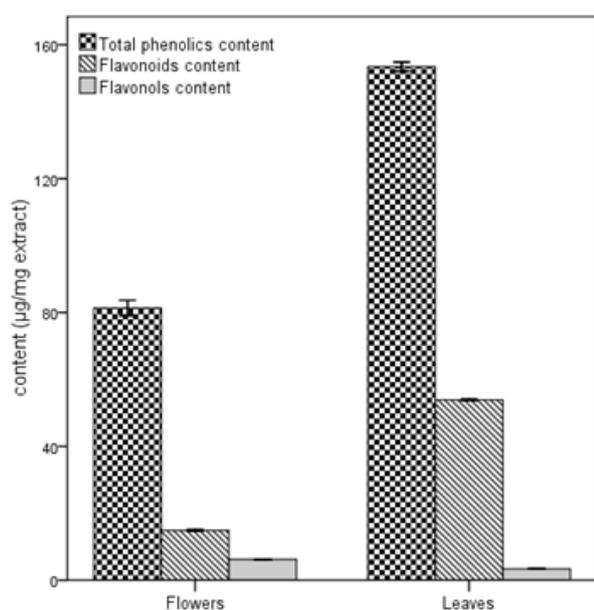


Figure 1. The bioactive components of *Phlomis biloba* aerial plant parts

Total flavonol contents

The values of TFOLC in leaf and flower extracts of *P. biloba* are also shown in Figure 1. Contrary to TPC and TFC results, the TFOLC values in the hydromethanolic extract of leaves ($03.39 \pm 0.06 \mu\text{g RE/mg}$) was significantly ($p < 0.05$) lower than that of flowers ($06.22 \pm 0.05 \mu\text{g RE/mg}$). Despite its wide distribution in medicinal plants, the flavonol fraction represents relatively minor concentrations in the phenolic mixture (El Gharras, 2009). According to a study conducted by Sarikurkcu *et al.* (2015), *P. armeniaca* yielded $1.20 \pm 0.05 \mu\text{g catechin equivalents/mg}$ in methanolic extract. In another investigation by Sarikurkcu *et al.* (2014), the TFOLC of various extracts obtained from *P. nissolii* and *P. pungens* fluctuated between 0.27 ± 0.04 to 2.88 ± 0.06 and 0.33 ± 0.05 to 3.49 ± 0.06 catechin equivalents/mg, respectively.

Antioxidant activity

The in vitro methods involved in the estimation of antioxidant potential of plant extracts are diverse, and differed in term of targeted oxidants which include free radicals and non-radical forms. Therefore, the use of multiple assays is recommended to cover various mechanisms of antioxidant action. In the present work, we have inspected the antioxidant potential of *P. biloba* through two complementary and universally-employed tests, namely DPPH free radical scavenging activity and β -carotene-linoleic acid system.

DPPH free radical scavenging

The free radical scavenging abilities of the standards and extracts analysed are listed in Figure 2. The strongest anti-radical activity was recorded in leaf extract showing an IC_{50} of $47.78 \pm 1.12 \mu\text{g/mL}$, whereas the flower extract exhibited $90.85 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$. These findings indicate that the extracts obtained from *P. biloba* could significantly quench free radicals. However, none of the extracts displayed activity as strong as standard compounds: ascorbic acid ($03.82 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$), α -tocopherol ($07.43 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$) and BHT ($17.95 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$). Even so, natural antioxidants are considered as harmless anti-radical agents to human health when compared to synthetic ones which are viewed to have risks of possible toxicity (Venskutonis *et al.*, 2004).

β -Carotene/linoleic acid system

In this β -carotene bleaching model, β -carotene discolours rapidly in the absence of antioxidant that could delay the extent of β -carotene destruction by neutralising the free radicals (Ali Haimoud *et*

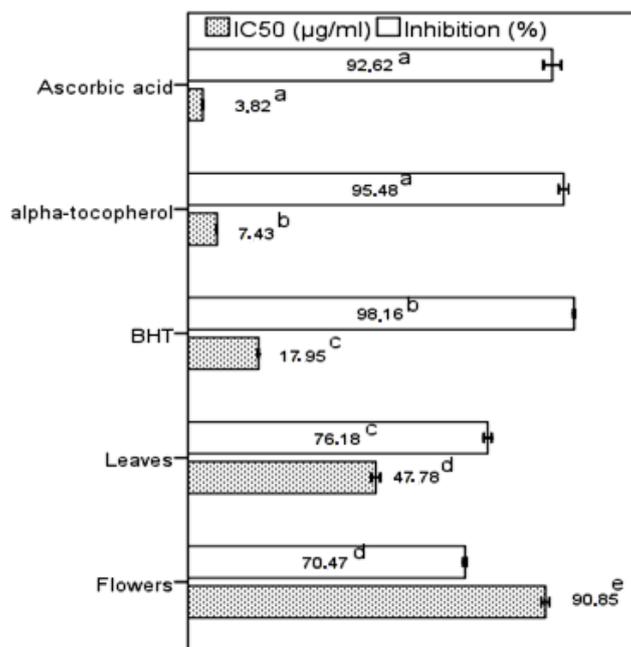


Figure 2. Antioxidant activities of *Phlomis biloba* aerial plant parts and standard compounds as assessed by DPPH free radical scavenging (IC₅₀) and β -carotene bleaching (% inhibition). Different letters in the same assay indicate significant difference at $p < 0.05$.

al., 2016). The effect of hydromethanolic extract obtained from leaves prepared at 2 g/L exhibited the strongest activity than the extract obtained from flowers (76.18 ± 0.98 vs. $70.47 \pm 0.48\%$; Figure 2). These results described the powerful antioxidant potency of *P. biloba* that can scavenge ROS in lipid milieu. The antioxidant activities of synthetic antioxidants were also screened. In general, the inhibition potential of corresponding extracts and standard antioxidants significantly decreased ($p < 0.05$) in the order of BHT ($98.16 \pm 0.22\%$) > α -tocopherol ($95.48 \pm 1.26\%$) = ascorbic acid ($92.62 \pm 2.25\%$) > leaf extract > flower extract. As can be seen from Table 1, the correlation analysis between antioxidant activity and phytochemical amounts revealed that TPC and TFC had a strong positive correlations ($p < 0.01$) with antioxidant activity. The correlations data of TPC were 0.998 and 0.975 with DPPH free radical scavenging effect and inhibition of β -carotene bleaching, respectively. There was also a high significant positive correlation ($p < 0.01$) between TFC and TPC (0.999 and $p < 0.001$). This relationship indicates that flavonoids contribute greatly in this bioactivity together with other phenolic compounds. The strong correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of *P. biloba* is in concordance with the data obtained for *P. nissolii*, *P. pungens* (Sarikurkcu et al., 2014) and 30 plant extracts of industrial interest (Dudonne et al., 2009).

Table 1. Pearson correlation coefficients between assays for *Phlomis biloba*.

	TPC	TFC	TFOLC	DPPH*	CART
TPC	1				
TFC	0.999**	1			
TFOLC	-0.998**	-0.999**	1		
DPPH*	0.998**	0.998**	-0.996**	1	
CART	0.975**	0.978**	-0.980**	0.970**	1

TPC: total phenolic content; TFC: total flavonoid content; TFOLC: total flavonol content; DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; CART: β -carotene/ linoleic acid.

*The values of DPPH assay were taken as $1/IC_{50}$

**Correlation is significant at $p < 0.01$.

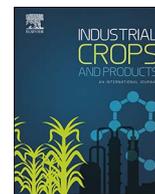
Conclusion

In the present work, *P. biloba* was demonstrated to be a rich source of bioactive compounds offering significant antioxidant potentials. The antioxidant activity was found to correlate with the polyphenolic content. In the future, further investigations should be carried out to explore their potencies in functional food applications. In the motivation to further utilise *P. biloba*, their natural antioxidants could also be characterised and used as alternative natural antioxidants in the food industry in order to promote public health via their protective effects against diseases related to ROS and to satisfy the increasing demand for natural-based products.

References

- Algieri, F., Zorrilla, P., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, N., Bañuelos, O., González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., ... and Galvez, J. 2013. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzene sulphonic acid model of rat colitis. *Journal of Ethnopharmacology* 146: 750-709.
- Ali Haimoud, S., Allem, R. and Merouane, A. 2016. Antioxidant and anti-inflammatory properties of widely consumed date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit varieties in Algerian oases. *Journal of Food Biochemistry* 40: 463-471.
- Benthams, G. 1832. A description of the genera and species of plants of the order Labiatae. London: Redgay, J. and Piccadilly, S.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V. and Martens, S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 1-20.
- Couladis, M., Tanimanidis, A., Tzakou, O., Chinou, I. B. and Harvala, C. 2000. Essential oil of *Phlomis lanata* growing in Greece: chemical composition and antimicrobial activity. *Planta Medica* 66: 670-672.
- Das, J., Thapa, S., Pradhan, D., Thorat, S. S. and Talukdar, N. C. 2013. Intra-specific genetic diversity, phytochemical analysis and antioxidant activities of a potential Himalayan *Swertia* (*Swertia bimaculata* Hook. F. and Thomas.). *Industrial Crops and Products* 49: 341-347.
- Dellai, A., Ben Mansour, H., Limem-Ben Amor, I., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Ghedira, K. and Chekirghedira, L. 2009. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the flowers of *Phlomis crinita* Cav. ssp. mauritanica munby from the center of Tunisia. *Drug and Chemical Toxicology* 32(3): 283-292.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. and Ju, Y-H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(3): 296-302.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Merillon, J-M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1768-1774.
- El Gharras, H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 2512-2518.
- Gürbüz, I., Üstün, O., Yesilada, E., Sezik, E. and Kutsal, O. 2003. Antiulcerogenic activity of some plants used as remedy in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 88: 93-97.
- Jabeen, B., Riaz, N., Saleem, M., Naveed, M. A., Ashraf, M., Alam, U., Rafiq, H. M., Tareen, R. B. and Jabbar, A. 2013. Isolation of natural compounds from *Phlomis stewartii* showing alpha-glucosidase inhibitory activity. *Phytochemistry* 96: 443-448.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Seguin, E., Tillequin, F. and Bruneau, C. 2005. A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) (*Lamiaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 813-816.
- Kumar, R., Bhan, S., Kalla, A. K. and Dhar, K. L. 1992. 28-noroleana-16,21-diene triterpens from *Phlomis spectabilis*. *Phytochemistry* 31(8): 2797-2799.
- Li, M. X., Shang, X. F., Jia, Z. P. and Zhang, R. X. 2010. Phytochemical and biological studies of plants from the genus *Phlomis*. *Chemistry and Biodiversity* 7: 283-301.
- Limem-Ben Amor, I., Neffati, A., Ben Sgaier, M., Bhourri, W., Boubaker, J., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ben Ammar, R., Chraief, I., Hammami, M., Ghoul, M., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K. 2008. Antimicrobial activity of essential oils isolated from *Phlomis crinita* Cav. ssp. Mauritanica Munby. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 845-849.
- Limem-Ben Amor, I., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Neffati, A., Bhourri, W., Bouhlel, I., Chouchane, N., Kilani, S., Guedon, E., Ghoul, M., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. 2009. Investigation of biological activity of polar extracts isolated from *Phlomis crinita* Cav ssp. mauritanica Munby. *Drug and Chemical Toxicology* 32(1): 38-46.
- Lin, J-N. and Weng M-S. 2006. Flavonoids as Nutraceuticals. In Grotewold, E. (Ed). *The Science of Flavonoids*, p. 213-238. New York: Springer.
- Mahdi-Pour, B., Jothy, S. L., Yoga Latha, L., Chen, Y. and Sasidharan, S. 2012. Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(12): 960-965.
- Merouane, A., Noui, A., Medjahed, H., Nedjari Benhadj Ali, K. and Saadi, A. 2014. Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8(4): 1865-1870.
- Muid, S., Ali, A. M., Yusoff, K. and Nawawi, H. 2013. Optimal antioxidant activity with moderate concentrations of Tocotrienol rich fraction (TRF) in in vitro assays. *International Food Research Journal* 20(2): 687-694.
- Sarikurku, C., Uren, M. C., Tepe, B., Cengiz, M. and Kocak, M. S. 2015. *Phlomis armeniaca*: Phenolic compounds, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products* 78: 95-101.
- Sarikurku, C., Uren, M. C., Tepe, B., Cengiz, M. and Kocak, M. S. 2014. Phenolic content: enzyme inhibitory and antioxidative activity potentials of *Phlomis nissolii* and *P. pungens* var. *pungens*. *Industrial Crops and Products* 62: 333-340.
- Sarkhail, P., Abdollahi, M., Fadayevatan, S., Shafiee, A., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Esmaily, H. and Amin, G. 2010. Effect of *Phlomis persica* on glucose levels and hepatic enzymatic antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Magazine* 6(Suppl 23): 219-224.

- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, vol. 299. San Diego, CA: Academic Press.
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E. and Sarikurkcu, C. 2011. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia* 82: 237-246.
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A. and Pardossi, A. 2016. *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: Bioactivity, industrial prospects and role of positive-stress. *Industrial Crops and Products* 83: 241-254.
- Uysal, A., Gunes, E., Sarikurkcu, C., Celik, H., Durak, Y. and Uren, C. M. 2016. New prospective materials for chemoprevention: Three *Phlomis*. *British Journal of Pharmaceutical Research* 10(3): 1-13.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J. and Spencer, J. P. 2010. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2: 1106-1131.
- Venskutonis, P. R. 2004. Food additives: the dilemma of “synthetic or natural”. *Acta Alimentaria* 33: 1-5.
- Zhang, Y. and Wang, Z. Z. 2009. Phenolic composition and antioxidant activities of two *Phlomis* species: a correlation study. *Comptes Rendus Biologies* 332(9): 816-826.



Impact of removal of micro and nano sized particles on the phenolic content and antioxidant activity: Study on aqueous and methanolic leaves extracts of *Phlomis crinita*

Abdelaziz Merouane^{a,b,*}, Abdelkader Saadi^b, Abdallah Noui^{a,b}

^aLaboratory of Natural Bio-Resources, Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria

^bFaculty of Life and Natural Sciences, Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Phlomis genus
Natural antioxidants
Microparticles
Nanoparticles

ABSTRACT

Due to the excellent ethnopharmacological properties of *Phlomis crinita*, it is widely used as natural remedy in the Mediterranean region. This study inspects the effect of micro and nano sized particles, contained in aqueous and hydromethanolic leaves extracts, on the antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents. The macro particles were removed from extracts via filtration whereas the micro and nano particles were isolated through speed centrifugation. Antioxidant activities were screened in vitro by β -carotene-linoleic acid and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assays.

The results showed that removal of microparticles don't affect the properties of extracts, whereas the nanoparticles contributed much in the content of total phenolics and antioxidant potencies of both extracts. The highest impact of nanoparticles removal on antioxidant activity was observed in methanolic extract losing 72% of β -carotene bleaching inhibition and four-doubled its IC₅₀ index. These findings suggest that nano sized particles are the nature's store of bioactive constituents in herbal extracts, therefore their retention is highly recommended to preserve the totality of antioxidant capacities.

1. Introduction

Phenolic compounds play a crucial role in the pharmacological properties of herbal extracts. This class is considered as the most group of plant secondary metabolites studied during the last decade with more than 301,483 data and their antioxidant activities have been scientifically reported (Elsevier, 2017). Moreover, these compounds participate potentially in the enzyme inhibitory (Sarikurku et al., 2015), anti-inflammatory (Mohajer et al., 2005), antimicrobial (Bahadori et al., 2015), antiamebic (Tepe et al., 2011), antiviral (Wang et al., 2009), anti-aging (Paredes-Lopez et al., 2010), cardioprotective, neuroprotective and anti-carcinogenic (Crozier et al., 2009) activities of plant-based remedies.

The genus *Phlomis* L., one of the largest genera of *Lamioidae* subfamily (*Lamiaceae*), with more than 100 species with distribution's zone starting from the Mediterranean region to the central Asia and China (Sarikurku et al., 2015). The species of this genus have been mentioned for their phytotherapeutic uses since the years of Dioscorides (Couladis et al., 2000). They are used essentially as traditional remedy for ulcer, inflammation, hemorrhoids and healing of wounds (Couladis et al., 2000; Kirmizibekmez et al., 2005; Limem-Ben Amor et al., 2009).

They are also recommended in the treatment of gastrointestinal complaints (Sarkhail et al., 2010), and as prophylactics against liver, kidney, bone and cardiovascular diseases (Jabeen et al., 2013).

Several studies have mentioned *Phlomis* species as a good natural source of various bioactive compounds such as phenylpropanoids, iridoids, diterpenoids, phenylethanoids, alkaloids (Kumar et al., 1992) and phenolic compounds dominated by phenolic acids and flavonoids (Kabouche et al., 2005; Sarikurku et al., 2015). This chemical mixture offer to the species a various beneficial bio-activities (Algieri et al., 2013; Dellai et al., 2009; Gürbüz et al., 2003; Limem-Ben Amor et al., 2009; Sarikurku et al., 2015).

Despite the numerous investigations realized on the screening of phenolic compounds and antioxidant activity of *Phlomis* species, all of them have been focused only on the extracts, where the dosages were performed in the preparations obtained by maceration in water or organic solvents followed by filtration. The current study looks differently to the extracts, which contain microparticles and nanoparticles escaping the filtration step. To the best of our knowledge, there is no report carried out on the studying of the effect of removal of micro and nanoparticles from extracts on the phenolic contents and antioxidant activity of *Lamiaceae* species.

* Corresponding author at: Faculty of Life and Natural Sciences, Hassiba Benbouali University, Ouled Fares-Chlef, Algeria.
E-mail address: a.merouane@univ-chlef.dz (A. Merouane).

Therefore, the current study was designed to investigate and compare the importance of micro and nanoparticles in the phenolic content and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts prepared from leaves of *Phlomis crinita* widely used as wound healing in Algeria.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

HPLC grade methanol was purchased from VWR International (Leuven, Belgium), HPLC grade chloroform, aluminum chloride, Gallic acid, Quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), β -carotene and Linoleic acid were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Folin–Ciocalteu’s phenol reagent and butylated hydroxyl toluene (BHT) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Plant material

Leaves of *P. crinita* were harvested during flowering season in May 2017 from Sidi Amer region (36°10′56″ N, 01°18′27″ E) located in Chlef province, Algeria. The taxonomic identification of this species was proved by botanist Mr. Abdeldjebbar Rouabhi in the department of Life and Natural Sciences, Chlef University. The voucher specimen has been deposited at the Herbarium of Laboratory of Natural Bio-Resources, Chlef University (Voucher No: LBRN 2017/003). Leaves were separately dried under shade at $29 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity of 12–60%, then finely powdered and kept in airtight bottles at 4°C until use.

2.3. Preparation of extracts

In order to prepare the initial extracts, 0.5 g of fine powder of *P. crinita* leaves was macerated separately in 100 mL of 80% methanol and distilled water at room temperature under continuous shaking (WIS-10, Daihan Scientific co. Ltd., Korea) for 24 h. The samples were then filtered by Whatman No. 1 filter paper and coded PM_0 . Extracts yield were calculated as 34.46% and 14.04% (w/w) for methanolic and aqueous extracts respectively.

The particles suspended in the initial extracts (PM_0) were separated via differential centrifugation according to Gopal et al. (2016) with modifications (with temperature control at 4°C) at $11929 \times g$ for 5 min to eradicate microparticles resulting in methanolic and aqueous extracts without microparticles coded PM_1 , followed by centrifugation at $47718 \times g$ for 4 h to remove nanoparticles, the obtained supernatants were coded PM_2 . All the six extracts were stored at 4°C until further investigations. The codes attributed to extracts will be used in following sections.

2.4. Assay for total phenolic contents

The total phenolic content (TPC) was determined by the spectrophotometric method given by Singleton et al. (1999), involving Folin–Ciocalteu reagent and gallic acid as standard with slight modifications. The reaction mixture was prepared by mixing 0.1 mL of each extract prepared at 2 mg mL^{-1} and 2.5 mL of 10% Folin–Ciocalteu’s reagent in water. After 10 min, 2.5 mL of 7.5% NaHCO_3 was added. The mixture was incubated in dark at room temperature for 45 min and the absorbance was read at 765 nm using UV–vis spectrophotometer (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) against blank contemporaneously prepared by replacing extract with methanol. All tests were carried out in triplicate. The phenolic amount was expressed as μg gallic acid equivalents/mg of dry matter ($\mu\text{g AGE/mg DM}$) based on calibration line constructed from standard solution of gallic acid.

2.5. Assay for total flavonoids

The determination of total flavonoid content (TFC) was based on the method described by Tepe et al. (2011) with slight modifications. In brief, 0.5 mL of each extract prepared at 2 mg mL^{-1} was mixed with 1 mL of 2% aluminum chloride (AlCl_3) dissolved in methanol. The mixture was allowed to stand for one hour in dark at room temperature and measured spectrophotometrically (Optizen 2120, Mecasys Co. Ltd., Korea) at 420 nm against blank tube prepared by replacing the extract with methanol. The same protocol was followed for the standard solution of quercetin and the calibration graph was constructed. All tests were realized in triplicate. The flavonoid content was calculated from standard calibration curve constructed with various concentrations of quercetin and expressed as μg quercetin equivalents/mg of dry matter ($\mu\text{g QE/mg DM}$).

2.6. Antioxidant activity

2.6.1. DPPH free radical scavenging assay

The ability of *P. crinita*’s extracts and standard BHT to quench free radicals was measured from the bleaching of purple color of DPPH solution. The DPPH assay was conducted according to Muid et al. (2013). 0.5 mL of each extract at various concentrations ($20\text{--}160 \mu\text{g mL}^{-1}$) was added to 1 mL of methanolic DPPH solution prepared at 0.1 mM. The mixture was homogenized vigorously and stored in dark at room temperature for 30 min. The same procedure was repeated for the standard BHT. UV–vis readings were performed using a spectrophotometer Optizen 2120 at 517 nm. Inhibition of DPPH free radicals in percent (I%) was calculated from the following formulae:

$$I(\%) = \left(\frac{A_0 - A_s}{A_0} \right) \times 100$$

Where A_0 and A_s symbolize the absorbance of the DPPH solution without extract and test sample respectively. The antioxidant activity was expressed in term of IC_{50} ($\mu\text{g DM mL}^{-1}$) defined as the concentration of test sample which reduced the initial DPPH concentration by 50%. All samples were prepared in three independent experiments.

2.6.2. β -Carotene–linoleic acid assay

In this test, antioxidant activity was evaluated by indirectly measuring the inhibition of volatile organic compounds and conjugated diene hydroperoxides resulting from linoleic acid oxidation (Dapkevicius et al., 1998). One mL of β -carotene solution in chloroform (0.5 mg in 10 mL) was mixed with 25 μL of linoleic acid and 200 mg of Tween 20. After complete evaporation of the chloroform using a vacuum evaporator at 40°C , 50 mL of distilled water (aerated with oxygen for 1 h) was added with vigorous shaking. 2.5 mL of this emulsion was dispersed in test tubes with 350 μL of the extracts or standard prepared at 2 mg mL^{-1} . The mixture was stored in dark at room temperature for 72 h. UV–vis readings were performed against blank (consisting of 350 μL methanol in 2.5 mL of emulsion) using a spectrophotometer Optizen 2120 at 490 nm. Total antioxidant activity was expressed in term of percentage inhibition relative to the control BHT calculated in following way:

$$\% \text{ Inhibition} = (A_s/A_c) \times 100$$

Where A_s represents the absorbance of test sample after incubation period, and A_c symbolizes the absorbance of control BHT at the moment of preparation ($t = 0$).

2.7. Statistical analysis

All results were presented as mean value \pm standard deviation of three repetitions. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and statistical significance between mean values was assessed

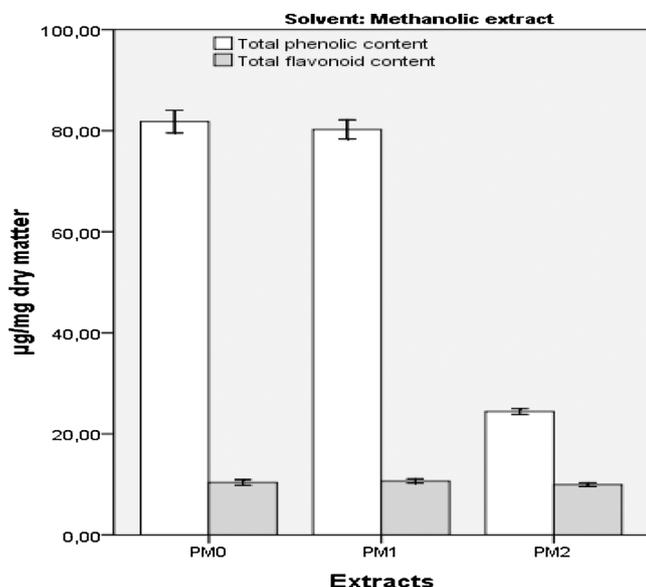


Fig. 1. Total phenolics and total flavonoids in methanolic extracts of *P. crinita*. PM₀: without macroparticles; PM₁: without microparticles; PM₂: without nanoparticles.

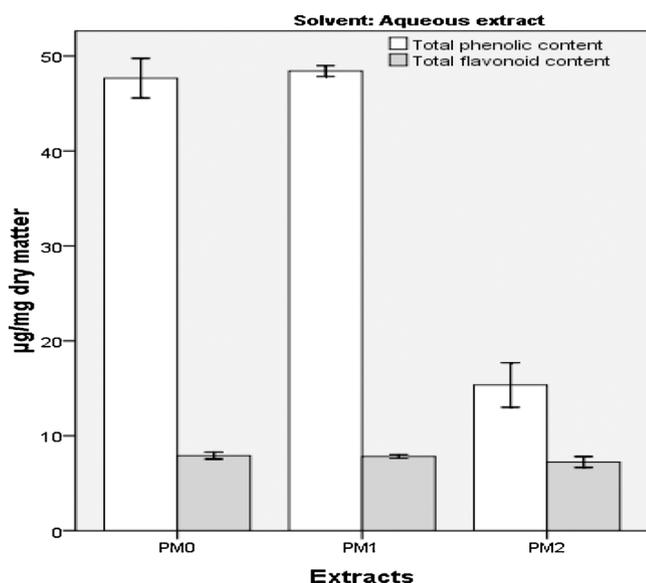


Fig. 2. Total phenolics and total flavonoids in aqueous extracts of *P. crinita*. PM₀: without macroparticles; PM₁: without microparticles; PM₂: without nanoparticles.

by Turkey's test at the confidence level of 95%. Calculations and figures were accomplished using statistical package for the social sciences 16.0 software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Phytochemical contents

The both aqueous and methanolic extracts obtained from *P. crinita* and their free micro and nano particles extracts obtained at 11929 and 47718 × g respectively were studied for their phenolic and flavonoid amounts. The results are shown in Figs. 1 and 2.

The methanolic extract was found to contain the highest quantities of TPC (PM₀ = 81.80 ± 2.25 µg GAE/mg DM) and TFC (PM₀ = 10.38 ± 0.55 µg QE/mg DM) than the aqueous extract (PM₀) showing 47.67 ± 2.08 µg GAE/mg DM (TPC) and 7.91 ± 0.37 µg QE/mg DM (TFC). The elimination of microparticles from PM₀ of methanolic and aqueous extracts has not affected the contents of TPC

Table 1

Antioxidant activity of the extracts with and without particles from *P. crinita*.

Samples	Extracts	DPPH radical (IC ₅₀ : mg/mL)	β-Carotene bleaching (%)
Methanolic extract	PM ₀	1.04 ± 0.02 ^a	74.49 ± 1.42 ^a
	PM ₁	1.18 ± 0.14 ^a	71.57 ± 1.89 ^a
	PM ₂	4.17 ± 0.29 ^b	20.51 ± 1.42 ^b
Aqueous extract	PM ₀	1.70 ± 0.14 ^c	40.18 ± 0.22 ^c
	PM ₁	1.68 ± 0.22 ^c	38.58 ± 0.67 ^c
	PM ₂	3.07 ± 0.26 ^d	29.26 ± 1.56 ^d
BHT	–	0.68 ± 0.06 ^e	89.57 ± 2.12 ^e

Notes: a–e: values (mean ± standard deviation, n = 3) in the same column sharing different letters are significantly different (p < 0.05).

BHT: butylated hydroxytoluene.

IC₅₀: the concentration of test sample which reduced the initial DPPH concentration by 50%.

PM₀: initial extract without macroparticles; PM₁: extract without microparticles; PM₂: extract without nanoparticles.

(p < 0.05) neither positively nor negatively.

As can be seen from the data presented in Figs. 1 and 2, the elimination of nano sized particles from extracts resulted in a remarkable decline of TPC contents where the methanolic extract lost 70.13% (PM₂ = 24.43 ± 0.59 µg GAE/mg DM) of its potential whereas the TPC amount diminished in aqueous extract from 47.67 ± 2.08 (PM₀) to 15.35 ± 2.35 µg GAE/mg DM (PM₂) which means about 68% of its content.

With respect to the flavonoids amounts, the removal of micro and nano sized particles did not result in any significance variation and the flavonoid content was usually found to be similar (p < 0.05) to the extracts containing particles.

A previous study conducted by Gopal et al. (2016) using centrifugation in the elimination of particles from green tea extracts, indicated that phenolic contents were generally affected by the removal of nanoparticles, whereas the flavonoid contents were similar in free and contained nanoparticles extracts. Findings of the current study are in accordance with this previous investigation.

The extracts from *Phlomis* species have been noticed previously as a rich source of phenolic compounds, dominated essentially by phenolic acids (Sarikurku et al., 2015; Zhang and Wang, 2009) and flavonoids (Kabouche et al., 2005; Kumar et al., 1992), in the current study, the nanoparticles contained in the methanolic and aqueous extracts appear to contribute mainly in the TPC amounts. The performance and properties of these nano sized particles are not depending only on their chemical composition, but also on surface charge, structures morphology, size and shape (Steichen et al., 2013).

Despite the divergence of phenolic and flavonoid amounts between extraction solvents, the general behavior of these bioactive compounds was similar after elimination of nanoparticles. This finding can be attributed to the resemblance of nanoparticles suspended in both extract that depend on the physical properties of medium such as density, viscosity and ionic strength (Akbulut et al., 2012), especially with presence of aqueous fraction in hydromethanolic extract at rate of 20% playing the role of rapprochement factor between properties of extraction solvents used. To our best knowledge, there are no previous reports in literature studying the behavior of TPC and TFC in various solvents after elimination of nanoparticles, our report presents pioneer results in this topic by exploring aqueous and methanolic extracts.

The use of refrigeration system maintaining temperature at 4 °C is not recommended only for the protection of phenolic compounds against oxidation, but also to enhance the efficiency of separation process by assuring the stability of suspensions viscosity (Kowalczyk and Lagzi, 2011) that decrease under the action of heating during centrifugation (Akbulut et al., 2012).

TABLE 2
Pearson correlation coefficients between assays for leaves extracts of *P. crinita*.

	Methanolic extract				Aqueous extract			
	TPC	TFC	DPPH	CART	TPC	TFC	DPPH	CART
TPC	1				1			
TFC	0.592	1			0.605	1		
DPPH	−0.995 ^b	−0.536	1		−0.975 ^b	−0.527	1	
CART	0.998 ^b	0.550	−0.997 ^b	1	0.958 ^b	0.753 ^a	−0.908 ^b	1

TPC: total phenolic content; TFC: total flavonoid content; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; CART: β -carotene/linoleic acid.

^a Correlation is significant at the 0.05 level.

^b Correlation is significant at the 0.01 level.

3.2. Antioxidant activity

Table 1 summarizes data on the antioxidant activity evaluated by DPPH free radical scavenging and β -carotene bleaching methods of the *P. crinita* extracts. As can be seen from the Table, PM₀ of methanolic extract exhibited the highest antioxidant potential by DPPH free radical and β -carotene/linoleic acid assays indicating 1.04 ± 0.02 mg DM/mL and $74.49 \pm 1.42\%$ respectively.

Regardless of the statistical difference between IC₅₀ values of aqueous and methanolic extracts, the antiradical action of PM₀ (1.70 ± 0.14 mg DM/mL) of aqueous extract was regarded as very important potential compared to its β -carotene bleaching inhibition showing $40.18 \pm 0.22\%$. These results describe the powerful antioxidant potency of *P. crinita* widely used as medicinal herb in Mediterranean region. The potential of this species has been evidenced previously by Limem-Ben Amor et al. (2009) using DPPH free radical without quantification.

For the both extracts, the antioxidant activities were found independent of the micro sized particles. A slight decrease was observed for this potential but not significantly ($p > 0.05$). This could be explained by the polyphenolic contents which showed similar comportment after elimination of microparticles from extracts.

In the case of PM₂ (without nanoregime) extracts of *P. crinita* leaves, the behavior was totally different. The methanolic extract loses its superiority versus aqueous extract showing 3.07 ± 0.26 mg/mL as IC₅₀ value and $29.26 \pm 1.56\%$ as β -carotene bleaching inhibition.

The effect of the smallest particles on the antioxidant potencies of extracts was significantly different, the highest impact of their elimination was observed in the methanolic extract, where IC₅₀ value was found four-fold concentrated than PM₀ and only less than two-fold for water extract. Moreover, up to 72% of decrease was observed in the capacity of β -carotene bleaching inhibition for methanolic extract, while the potency of water extract declined in this test about 27%.

As can be seen from Table 2, none of the extracts displayed activity as strong as standard antioxidant compound BHT at $p < 0.05$. However, natural antioxidants are considered as harmless anti-radical agents to human health when compared to synthetic ones viewed as risk for their possible toxicity (Venskutonis, 2004).

Table 2 shows bivariate correlation between assays of extracts obtained from *P. crinita*. In general, the Pearson test showed a strong and significant (at $p < 0.01$) positive correlation between TPC and antioxidant activities for both extracts. The TFC of aqueous extract was positively correlated ($r = 0.753$) with β -carotene/linoleic acid assay.

4. Conclusions

The current study examined the impact of particles contained in extracts of *P. crinita* on antioxidant potential, the results reveals that nanoparticles play the fundamental role in the antioxidant activity and polyphenolic amounts of aqueous and methanolic extracts, but they are not the individual contributors. Therefore, the retention of the nanoregime in herbal extracts is highly recommended to enhance their

potencies. Further studies are needed to characterize the physico-chemical properties of the nanoparticles and their bioactivities.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgements

Authors would like to thank Professor Ahmed Aichouni for the excellent laboratory facilities and to Mr. Abdeldjebbar Rouabhi for the plant identification.

References

- Akbulut, O., Mace, C.R., Martinez, R.V., Kumar, A.A., Nie, Z., Patton, M.R., Whitesides, G.M., 2012. Separation of nanoparticles in aqueous multiphase systems through centrifugation. *Nano. Lett.* 12, 4060–4064.
- Algieri, F., Zorrilla, P., Rodríguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, N., Bañuelos, O., González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Molero-Mesa, J., Zarzuelo, A., Utrilla, M.P., Rodríguez-Cabezas, M.E., Galvez, J., 2013. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *J. Ethnopharmacol.* 146, 750–759.
- Bahadori, M.B., Valizadeh, H., Asghari Dinparast, L., Farimani, M.M., Bahadori, S., 2015. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *J. Funct. Foods* 18, 727–736.
- Couladis, M., Tanimanidis, A., Tzakou, O., Chinou, I.B., Harvala, C., 2000. Essential oil of *Phlomis lanata* growing in Greece: chemical composition and antimicrobial activity. *Planta Med.* 66, 670–672.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1001–1043.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linsen, P.H., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* 77, 140–146.
- Dellai, A., Ben Mansour, H., Limem-Ben Amor, I., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Ghedira, K., Chekir-ghedira, L., 2009. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the flowers of *Phlomis crinita* Cav. ssp. mauritanica mundy from the center of Tunisia. *Drug Chem. Toxicol.* 32 (3), 283–292.
- Elsevier, 2017. <http://www.sciencedirect.com/search?q=Phenolic%20compounds&show=25&sortBy=relevance>: (accessed 24.07.17).
- Gürbüz, I., Üstün, O., Yesilada, E., Sezik, E., Kutsal, O., 2003. Antitumor activity of some plants used as remedy in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 88, 93–97.
- Gopal, J., Muthu, M., Paul, D., Kim, D.-H., Chun, S., 2016. Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. *Sci. Rep.* 6, 1–14.
- Jabeen, B., Riaz, N., Saleem, M., Naveed, M.A., Ashraf, M., Alam, U., Rafiq, H.M., Tareen, R.B., Jabbar, A., 2013. Isolation of natural compounds from *Phlomis stewardii* showing alpha-glucosidase inhibitory activity. *Phytochemistry* 96, 443–448.
- Kirmizibekmez, H., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Dönmez, A., Çaliş, I., 2005. Identification by HPLC-PAD-MS and quantification by HPLC-PAD of phenylethanoid glycosides of five *Phlomis* species. *Phytochem. Anal.* 16, 1–6.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Seguin, E., Tillequin, F., Bruneau, C., 2005. A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) (*Lamiaceae*). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 813–816.
- Kowalczyk, B., Lagzi, I., 2011. Nanoseparations: strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 135–148.
- Kumar, R., Bhan, S., Kalla, A.K., Dhar, K.L., 1992. 28-noroleana-16,21-diene triterpens from *Phlomis spectabilis*. *Phytochemistry* 31 (8), 2797–2799.

- Limem-Ben Amor, I., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Neffati, A., Bhouiri, W., Bouhrel, I., Chouchane, N., Kilani, S., Guedon, E., Ghoul, M., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2009. Investigation of biological activity of polar extracts isolated from *Phlomis crinita* Cav ssp mauritanica Munby. *Drug Chem. Toxicol.* 32 (1), 38–46.
- Mohajer, M., Sarkhail, P., Hajarolasvadi, N., Zamani, M.J., Khorasani, R., Shafiee, A., Amin, G., Abdollahi, M., 2005. Antiinflammatory and analgesic effects of *Phlomis laceolata* Boiss. and Hohen. extracts and examination of their components. *Int. J. Pharmacol.* 2, 50–54.
- Muid, S., Ali, A.M., Yusoff, K., Nawawi, H., 2013. Optimal antioxidant activity with moderate concentrations of Tocotrienol rich fraction (TRF) in *in vitro* assays. *Int. Food Res. J.* 20 (2), 687–694.
- Paredes-Lopez, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Perez, M., Hernandez-Perez, T., 2010. Berries: improving human health and healthy aging: and promoting quality life-a review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 299–308.
- Sarikurkcü, C., Uren, M.C., Tepe, B., Cengiz, M., Kocak, M.S., 2015. *Phlomis armeniaca*: Phenolic compounds, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Ind. Crops Prod.* 78, 95–101.
- Sarkhail, P., Abdollahi, M., Fadayevatan, S., Shafiee, A., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Esmaily, H., Amin, G., 2010. Effect of *Phlomis persica* on glucose levels and hepatic enzymatic antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacogn. Mag.* 6 (Suppl. 23), 219–224.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Academic Press, San Diego, CA.
- Steichen, S.D., Caldorera-Moore, M., Peppas, N.A., 2013. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 416–427.
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., Sarikurkcü, C., 2011. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antimicrobial activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia* 82, 237–246.
- Venskutonis, P.R., 2004. Food additives: the dilemma of synthetic or natural. *Acta Aliment. Hung.* 33, 1–5.
- Wang, G.F., Shi, L.P., Ren, Y.D., Liu, Q.F., Liu, H.F., Zhang, R.J., Li, Z., Zhu, F.H., He, P.L., Tang, W., Tao, P.Z., Li, C., Zhao, W.M., Zuo, J.P., 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antivir. Res.* 83, 186–190.
- Zhang, Y., Wang, Z.Z., 2009. Phenolic composition and antioxidant activities of two *Phlomis* species: a correlation study. *C. R. Biol.* 332 (9), 816–826.