

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Analyse de quelques métabolites secondaires
des feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en
deux périodes distinctes de l'année.**

Présenté par :

MEGHARBA Rayel

Soutenu le : 01 juillet 2025

Devant le jury composé de :

Mr	<i>HAMLAT Mourad</i>	MCB	Président
Mr	<i>BENADJAOUD Ali</i>	MCA	Encadreur
Mme	<i>ALI HUSSEIN Alaa</i>	MCB	Examinateuse

Année universitaire : 2024 / 2025

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je rends grâce à **Dieu**, le **Tout-Puissant**, qui m'a donné la force, la patience et la volonté nécessaires pour avancer dans ce travail avec foi et persévérence, malgré les difficultés rencontrées.

Je tiens ensuite à exprimer ma plus profonde gratitude à mon **encadrant**, Monsieur **Benadjaoud Ali**, pour sa disponibilité, ses conseils avisés, son accompagnement scientifique rigoureux et son soutien constant tout au long de la réalisation de ce mémoire. Son exigence et sa bienveillance ont été une source précieuse de motivation et d'apprentissage.

Mes sincères remerciements s'adressent également à **toute l'équipe du laboratoire de biotechnologie** de la faculté SNV, pour leur accueil chaleureux, leur assistance technique et leurs échanges enrichissants, qui ont grandement contribué au bon déroulement de mon travail.

Je remercie également les **membres du jury** qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je leur suis reconnaissante pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce mémoire, ainsi que pour leurs remarques constructives et leur bienveillance. Leur expertise constitue un véritable enrichissement scientifique pour ce travail.

Je n'oublie pas d'adresser ma reconnaissance la plus sincère à mes **chers parents**, pour leur amour inconditionnel, leurs encouragements et leur soutien moral et matériel sans faille. Leur confiance et leurs prières m'ont accompagné à chaque étape de ce parcours.

A toutes les personnes, de près ou de loin, qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail, je dis tout simplement : **Merci**.

DÉDICACES

À ma **famille bien-aimée**, pilier de mon existence.

À mon **père, Monsieur Abdelaziz**, et à ma **mère, Madame Ouarkoub Nacera**, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible, leurs sacrifices silencieux et leur confiance en moi, même dans mes moments de doute. Ce travail est l'accomplissement de vos prières et de votre patience.

À mes **sœurs** adorées, **Yasmine** et **Inas**, pour leur tendresse, leurs encouragements sincères, leur présence réconfortante et leur affection constante dans chaque étape de ma vie.

À mes **amis(es) sincères**, ceux qui sont restés présents, sincères et constants pour leur écoute, leur soutien moral, et les moments partagés qui ont rendu ce parcours plus doux.

Enfin, à **toutes celles et ceux qui croient en moi**, et qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire.

Merci du fond du cœur

Megharba Rayel

%	Pourcentage
°C	Degré celsius
±	Plus ou moins
[]	Concentration
λ	Longueur d'onde
ε	Coefficient d'extinction
AA	Acide ascorbique
AG	Acide gallique
C	Catéchine
DCPIP	2,6-dichloro-phénol-indophénol
E	Equivalent
Fig.	Figure
FT	Flavonoïdes totaux
L.	Linné
MDA	Malondialdéhyde
mn	Minute
MVS	Matière végétale sèche
pH	Potentiel hydrogène
Q	Quercétine
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rpm	Rotations par minute
Tab.	Tableau
TBA	Acide thiobarbiturique
TC	Tannins condensés
TCA	Acide trichloroacétique
TPC	Composés phénoliques totaux
v/v	volume par volume
vs	<i>Versus</i>

I. Introduction	01
II. Synthèse Bibliographique	03
II.1. Généralités sur <i>Marrubium vulgare</i> L.	03
II.1.1. Classification	03
II.1.2. Étymologie	03
II.1.3. Origine et distribution	03
II.1.4. Description	04
II.1.5. Ecologie et propagation	05
II.1.6. Composition chimique et principaux usages	06
II.1.7. Cycle de vie	07
II.2. Métabolites des plantes	08
II.2.1. Métabolites secondaires	08
II.2.1.1. Composés phénoliques simples	08
II.2.1.2. Polyphénols	09
II.2.2. Autres métabolites	13
II.2.2.1. Malondialdéhyde (MDA)	13
II.2.2.2. Acide ascorbique	14
III. Matériel & Méthodes	16
III.1. Matériel	16
III.1.1. Collecte des feuilles	16
III.1.2. Préparation des échantillons	16
III.2. Méthodes	17
III.2.1. Extraction et dosage des polyphénols totaux	17
III.2.1.1. Principe	17
III.2.1.2. Extraction	17
III.2.1.3. Dosage	17
III.2.1.4. Courbe étalon	18
III.2.2. Extraction et dosage des flavonoïdes totaux	18
III.2.2.1. Principe	18
III.2.2.2. Extraction	19
III.2.2.3. Dosage	19
III.2.2.4. Courbe étalon	19
III.2.3. Extraction et dosage des tannins condensés	20
III.2.3.1. Principe	20

III.2.3.2. Extraction	20
III.2.3.3. Dosage	20
III.2.3.4. Courbe étalon	21
III.2.4. Extraction et dosage de l'acide ascorbique	21
III.2.4.1. Principe	21
III.2.4.2. Extraction	22
III.2.4.3. Dosage	22
III.2.4.4. Courbe étalon	23
III.2.5. Extraction et dosage du malondialdéhyde (MDA)	23
III.2.5.1. Principe	23
III.2.5.2. Extraction et dosage	24
III.2.5.3. Calculs	24
III.2.6. Étude statistique	24
IV. Résultats & Discussion	25
IV.1. Résultats	25
IV.1.1. Composés phénoliques totaux	25
IV.1.2. Flavonoïdes totaux	25
IV.1.3. Tannins condensés	27
IV.1.4. Acide ascorbique	29
IV.1.5. Malondialdéhyde	30
IV.2. Discussion	31
IV.2.1. Composés phénoliques totaux	31
IV.2.2. Flavonoïdes totaux	33
IV.2.3. Tannins condensés	35
IV.2.4. Acide ascorbique	36
IV.2.5. Malondialdéhyde	37
V. Conclusion	39
VI. Références bibliographiques	41

N°	Titre	Page
01	Carte géographique de distribution mondiale de <i>Marrubium vulgare</i> L.	04
02	Photographie de <i>Marrubium vulgare</i> L. avec sa tige tomenteuse et blanchâtre, ses feuilles vertes, crénelées et ridées et ses nombreuses fleurs blanchâtres, réunies en denses glomérules verticillées.	05
03	Représentation de trois des composés les plus actifs du marrube vulgaire : deux di-terpènes (marrubiine et marrubiol) et un phénylpropanoïde (martinoside).	06
04	Représentation schématique d'un cycle de vie typique d'une plante pérenne.	07
05	Structure chimique de quelques exemples de composés phénoliques simples en C6 : phénol (hydroxybenzène), hydroquinone (hydroxyquinone) et catéchol.	09
06	Monographie des acides phénoliques.	09
07	Structure générale des coumarines aglycones, dérivés hydroxylés de la lactone coumarine.	10
08	Unités monolignols (monomères de la lignine). De gauche à droite : alcool p-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylque.	11
09	Structures chimiques des principales classes de flavonoïdes.	11
10	Unité répétitive de base des tannins condensés.	12
11	Mésomères du malondialdéhyde où la forme énolique (HOHC=CH-CHO) prédomine sur la forme dialdéhyde (OCH-CH ₂ -CHO).	13
12	Peroxydation des chaînes d'acides gras polyinsaturés par le radical HO [•] .	14
13	Structure de l'ascorbat et de ses dérivés monodéhydroascorbat et déhydroascorbat. Ces transitions sont liées à des facteurs stressants ou à l'activité d'enzymes.	14
14	Détoxication des formes actives de l'oxygène par le cycle ascorbate / glutathion (en bleu) et l'action des enzymes SOD (superoxyde dismutase) et CAT (catalase) (en noir).	15
15	Feuilles de <i>Marrubium vulgare</i> L. et leur lieu de récolte dans la région d'El-Mizab, à Draâ-El-Kaïd, au sud-est de Bejaia.	16
16	Préparation de poudres finement tamisées obtenues de feuilles desséchées de <i>Marrubium vulgare</i> L.	17

17 Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère d'acide gallique à 0,2 mg/mL (densité optique lue à $\lambda = 760$ nm). **18**

18 Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère de quercétine à 0,1 mg/mL (densité optique lue à $\lambda = 415$ nm). **19**

19 Réaction entre vanilline et tannins condensés avec formation d'un complexe rouge. La flèche indique un second site réactif. **20**

20 Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère de catéchine à 1 mM (densité optique lue à $\lambda = 500$ nm). **21**

21 L'acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique, et le DCPIP est réduit. Ce dernier est un indicateur redox, il est bleu lorsqu'il est oxydé et incolore lorsqu'il est réduit. **22**

22 Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère d'acide ascorbique à 1 mg/mL (densité optique lue à $\lambda = 515$ nm). **23**

23 Réaction du malondialdéhyde (MDA) avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique formant un complexe rose MDA-TBA₂. **24**

24 Evolution du contenu moyen en composés phénoliques totaux (équivalent en acide gallique) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). **25**

25 Evolution du contenu moyen en flavonoïdes totaux (équivalent en quercétine) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). **26**

26 Evolution du contenu moyen en tannins condensés (équivalent en catéchine) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). **28**

27 Evolution du contenu moyen en acide ascorbique (équivalent en acide ascorbique) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). **30**

28 Evolution du contenu moyen en malondialdéhyde (MDA) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). **31**

N°	Titre	Page
01	Classification hiérarchique de <i>Marrubium vulgare</i> L.	03
02	Classification des métabolites secondaires.	08
03	Coordonnées géographiques et climat de Drâa-El-Kaïd.	16
04	Composés phénoliques totaux (TPC) <i>vs</i> flavonoïdes totaux (FT).	27
05	Tannins condensés (TC) <i>vs</i> composés phénoliques totaux (TPC) + flavonoïdes totaux (FT).	29

INTRODUCTION

I. Introduction

Les plantes médicinales ont joué un rôle central dans les pratiques thérapeutiques des civilisations anciennes et restent aujourd’hui l’un des intérêts croissants de la recherche biomédicale, de la pharmacognosie et du secteur pharmaceutique. Le pouvoir thérapeutique de ces plantes repose sur la diversité des métabolites secondaires qu’elles élaborent : flavonoïdes, polyphénols, tannins, acides phénoliques, vitamines et huiles essentielles. Ces molécules bioactives sont avant tout essentielles aux plantes qui les mettent en place entre autres pour leur défense contre les stress environnementaux et de là pour prévenir les effets d’un stress oxydatif, qui pourrait nuire à l’ADN, aux lipides membranaires et aux protéines cellulaires (**Sytar & Hajihashemi, 2024**).

L’exploitation de telles plantes dans un contexte mondial changeant très marqué par les changements climatiques et la dégradation des ressources impose d’abonder vers l’exploitation de notre propre patrimoine floristique, très bien adapté à des conditions écologiques propres à un milieu donné, comme celui prévalant sur le flanc méditerranéen, qui se caractérise par une alternance de périodes sèches et humides, des températures élevées et une forte irradiation solaire (**Suc et al. 2018**).

Parmi les plantes médicinales d’intérêt qui poussent naturellement dans nos régions, figure une lamiacée d’un grand intérêt : *Marrubium vulgare* L. connue localement sous le nom de *tameriouat* et exploité pour ses propriétés expectorantes, anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antidiabétiques (**Parray et al. 2022**).

Son cycle de développement végétatif comprend une phase de germination, une phase de croissance végétative avec développement de nouvelles pousses (feuilles et tiges) au printemps, et une phase de fructification qui suit la floraison qui arrive vers la fin du printemps. Il s’agit d’une plante vivace, qui peut vivre plusieurs années et son cycle végétatif se répète chaque année avec un repos hivernal.

En fonction de ce cycle de développement, il nous paraît intéressant d’explorer son comportement dans son milieu par rapport à la variabilité de quelques métabolites secondaires dont les plus courants sont les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes totaux et les tannins condensés. Ces métabolites seront analysés au niveau des feuilles récoltées durant deux saisons de ce cycle de développement ; au mois de décembre et au mois de mars. Autrement, à l’entrée de la phase hivernale qui pourrait coïncider avec l’entrée dans une période de repos, puis au mois de mars lorsque la plante reprend son cycle de croissance en formant de nouveaux axes feuillés bien avant la floraison et la reproduction.

Dans un climat typique méditerranéen, la période hivernale est caractérisée par des températures basses et une humidité relativement élevée. Le mois de mars au contraire, marque la reprise de l’activité physiologique avec des conditions plus douces (**Ali, 2018**).

Il est également intéressant d'explorer le côté relatif au stress oxydatif qui pourrait prévaloir pendant ces deux périodes critiques pour un cycle de développement typique caractérisant une herbacée vivace telle que *Marrubium vulgare* L. Pour l'appréhender, un dosage du malondialdéhyde est envisagé, un des principaux marqueurs de la peroxydation lipidique (**Dizengremel, 2023**).

L'acide ascorbique ne sera pas en reste et sera considéré avec attention dans la présente étude ; c'est l'une des molécules de réponse au stress oxydatif, qui nous permettra de mesurer l'adaptation du système photosynthétique face aux variations saisonnières de lumière et de température (**Ghassemi-Golezani & Abdoli, 2022**).

Les données obtenues fourniront une vision intégrée des stratégies biochimiques adoptées par *Marrubium vulgare* L. en réponse aux contraintes de l'environnement accompagnant son cycle de développement, et contribueront à une meilleure valorisation de cette espèce dans les programmes de préservation et d'utilisation durable des ressources phytogénétiques locales.

*SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE*

II. Synthèse bibliographique

II.1. Généralités sur *Marrubium vulgare* L.

II.1.1. Classification

Marrubium vulgare L. fait partie de la famille des Lamiacées qui réunissent un nombre non négligeable d'espèces et notamment des plantes dites aromatiques comme le thym, le serpolet, le romarin, la sauge, l'origan et la menthe (Carović-Stanko et al. 2016 ; Lodhi et al. 2017).

La classification hiérarchique du *Marrubium vulgare* L. est comme suit (Tab. 1) :

Tableau 1 : Classification hiérarchique de *Marrubium vulgare* L. (Spichiger et al. 2004)

<i>Règne</i>	Plantae (plantes)
<i>Division</i>	Magnoliophyta (plantes à fleurs)
<i>Classe</i>	Magnoliopsida (dicotylédones)
<i>Ordre</i>	Lamiales
<i>Famille</i>	Lamiaceae (famille des lamiacées ou labiées)
<i>Genre</i>	<i>Marrubium</i>
<i>Espèce</i>	<i>Marrubium vulgare</i> L.

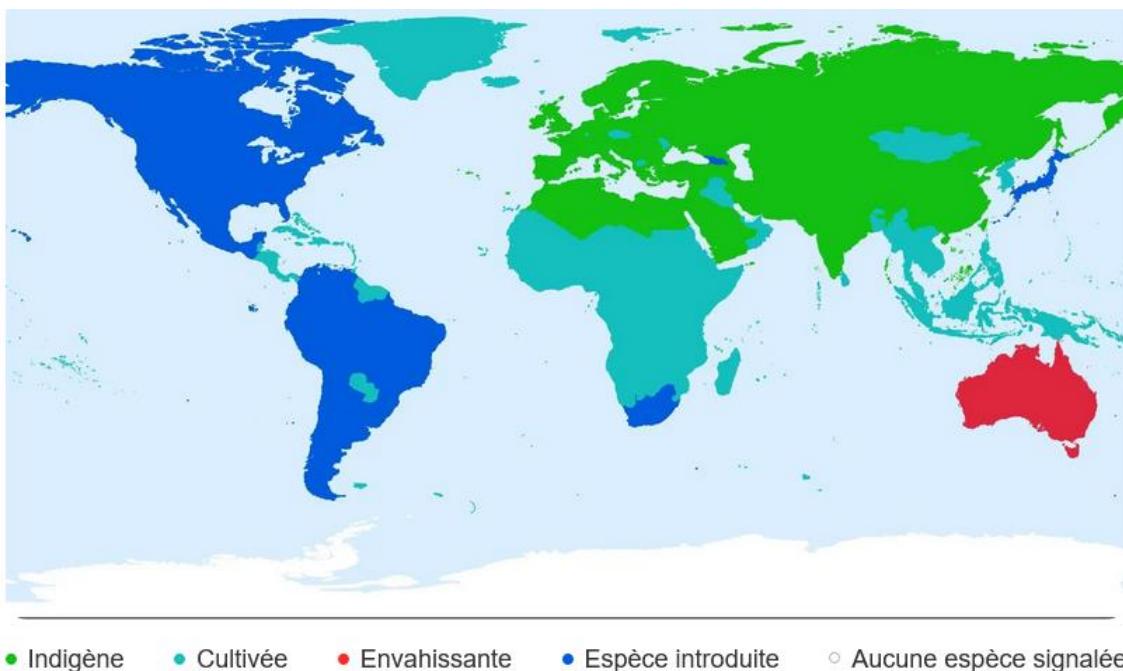
II.1.2. Étymologie

Le nom *Marrubium* est d'origine latine, mais il est souvent lié à l'hébreu "marrob", où "mar" signifie "amer" et "rob" signifie "beaucoup". L'extrait de cette espèce se caractérise d'ailleurs par sa grande amertume lorsqu'il est consommé en tisane. Certains pensent également à une origine latine liée à la ville romaine "Maria urbs". Le terme latin *vulgare* signifie "commun" ou "ordinaire", ce qui indique la grande présence et la facilité de trouver cette espèce (Acimović et al. 2020).

II.1.3. Origine et distribution

Marrubium vulgare L. est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie. En Europe, on le retrouve principalement dans les régions méditerranéennes et méridionales, mais aussi dans le reste de l'Europe. En Afrique du Nord, il est présent notamment en Algérie où il est considéré comme commun. En Asie, il est distribué dans plusieurs régions asiatiques (Fig. 1).

Dans le reste du monde, le marrube commun a été introduit, sinon cultivé en Afrique, en Amérique du Nord, en Amérique du Sud, en Australie et en Nouvelle-Zélande. Il est même considéré comme espèce envahissante en Australie (Fig. 1).



● Indigène ● Cultivée ● Envahissante ● Espèce introduite ○ Aucune espèce signalée

Figure 1 : Carte géographique de distribution mondiale de *Marrubium vulgare* L. *Source de la carte* : https://www.picturethisai.com/fr/wiki/Marrubium_vulgare.html

II.1.4. Description

Marrubium vulgare L. est décrite comme une plante vivace de 30-80 cm, tomenteuse-blanchâtre. Son caractère tomenteux dû aux poils fins, doux et entrelacés lui donnent un aspect feutré ou cotonneux. C'est ce qui protège la plante contre la sécheresse et la chaleur. Son odeur est forte et pénétrante, souvent décrite comme légèrement musquée ou rappelant le thym.

Ses tiges sont fermes, blanchâtres, dressées et peu rameuses. Ses feuilles pétiolées, ovales-orbiculaires, en cœur ou en coin à la base, irrégulièrement crénelées, ridées, tomenteuses, vertes en dessus et vertes-blanchâtres en dessous (**Fig. 2**).

Ses fleurs sont blanches et réunies en denses glomérules verticillées (**Fig. 2**). La corolle présente 2 lèvres dont l'inférieure est trilobée et la supérieure dilobée. Le calice est composé de 5 sépales soudés, velus, à 10 dents courtes et crochues. On compte 4 étamines dont 2 plus longues, soudées sur le tube de la corolle.

Ses fruits sont des tétra-akènes, fruits secs à 4 loges. La capsule du fruit contient jusqu'à 4 graines, de forme ovoïde, légèrement aplatis dans leur contour avec une surface rugueuse (**Quezel et Santa, 1963 ; Lodhi et al. 2017 ; Nedjimi et al. 2020**).



Figure 2 : Photographie de *Marrubium vulgare* L. avec sa tige tomenteuse et blanchâtre, ses feuilles vertes, crénélées et ridées et ses nombreuses fleurs blanchâtres, réunies en denses glomérules verticillées. *Source :* <https://plantsam.com/marrubium-vulgare/>

II.1.5. Ecologie et propagation

Marrubium vulgare L. est une plante ubiquiste, qui peut s'adapter à différents environnements. Il est commun dans les lieux incultes, les bords de chemins, les terrains vagues, et près des habitations. Il est également présent dans les matorrals. C'est une espèce qui pousse assez bien dans des sols légers, bien drainés et riches en azote. Il tolère bien les sols calcaires, apprécie bien les sols riches en azote et résiste aux conditions de sécheresse (Julve, 2021).

En Algérie et notamment au niveau des zones steppiques, le marrubie vulgaire pousse dans des sols calci-magnésiques à tendance xérique, à croûte calcaire moyennement à fortement riche en matière organique, très peu humides et à pH légèrement alcalin (Bouterfas et al. 2013 ; Nedjimi et al. 2020).

La propagation du marrube vulgaire se réalise par semis, par bouturage ou en divisant les racines, méthode d'ailleurs la plus utilisée. La floraison s'effectue principalement au printemps et les fleurs très odorantes attirent les abeilles (**Ahvazi et al. 2018**).

II.1.6. Composition chimique et principaux usages

On retrouve chez le marrube vulgaire des composés phénoliques, des glycosides de phénylpropanoïdes (**Fig. 3**), des flavonoïdes, des flavones méthoxylées, des composés azotés et des tannins caractéristiques de la famille des lamiacées. On y trouve également des mucilages et des huiles essentielles comme l' α -pinène et le limonène (**Lodhi et al. 2017**).

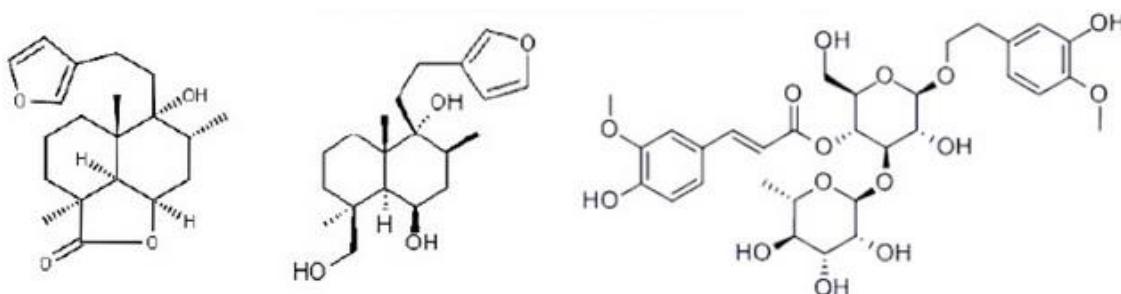


Figure 3 : Représentation de trois des composés les plus actifs du marrube vulgaire : deux di-terpènes (marrubiine et marrubiol) et un phénylpropanoïde (martinoside). *Source : Villanueva et al. (2017)*.

Ce qui caractérise également le marrube vulgaire est la présence de di-terpènes de type *labdane*, dont les représentants les plus importants sont la marrubiine (**Fig. 3**) et la pré-marrubiine. Il s'agit de composants amers utilisés comme expectorants contre les ballonnements et les flatulences, ainsi que pour redonner le goût chez les personnes qui ont perdu temporairement l'appétit. Dans ce cas, l'amertume du marrube stimule des récepteurs gustatifs de la langue, favorisant ainsi des sécrétions gastriques et biliaires qui redonnent l'appétit (**Yabrir, 2019 ; Aćimović et al. 2020 ; Hayat et al. 2020 ; Michel et al. 2020**).

Dans nos traditions, une décoction préparée à base de feuilles du marrube vulgaire plus du miel est utile pour traiter la toux, la bronchite, le rhume et les infections des voies respiratoires. On y traite également la jaunisse, les menstruations douloureuses, les ulcères, les plaies avec œdèmes, les mycoses et autres affections de la peau (**Masoodi et al. 2015 ; Amri et al. 2017 ; Lodihi et al. 2017**).

En phytothérapie moderne, le marrube vulgaire possède des propriétés anti-oxydantes, cardio-protectrices, vaso-relaxantes, gastro-protectrices, antispasmodiques, immuno-modulatrices, analgésiques et antidiabétiques (**Yabrir, 2019 ; Aćimović et al. 2020 ; Hayat et al. 2020 ; Michel et al. 2020**).

II.1.7. Cycle de vie

Marrubium vulgare L. est une herbacée pérenne avec un cycle de développement qui dure plusieurs années. Elle émerge au printemps faisant apparaître de nouvelles pousses (tiges et feuilles) et fleurit vers la fin du printemps, puis entre en dormance en hiver (Fig. 4).

Chaque hiver, les vieilles tiges souples et non ligneuses commencent à dépérir et la plante se prépare à la dormance hivernale. Elle survit grâce à son système racinaire, prêt à repousser au printemps en produisant de nouvelles pousses depuis la base (Fig. 4).

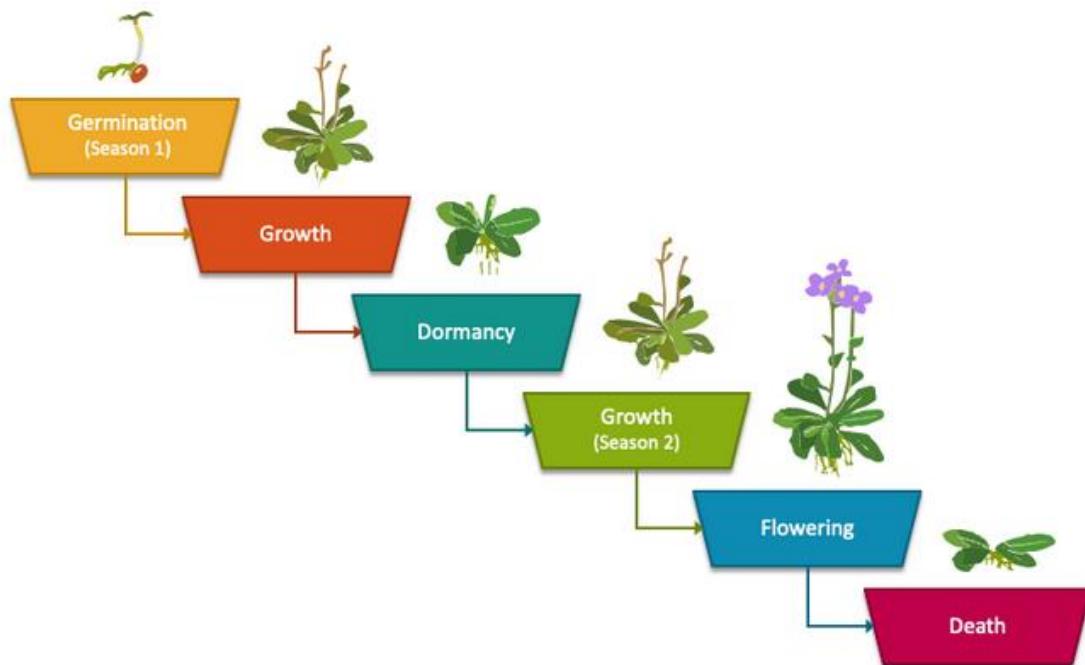


Figure 4 : Représentation schématique d'un cycle de vie typique d'une plante pérenne.

Source : <https://www.collidu.com/presentation-perennial-life-cycle>

Les toutes petites fleurs blanchâtres du marrubie vulgaire apparaissent en juin-juillet, voire jusqu'en automne. Après pollinisation et fécondation, les ovaires se développent en tétra-akènes enfermant des graines. A maturité, ces graines sont disséminées sur de courtes distances et leur germination se déroule en automne ou même en hiver en réponse à une pluviométrie suffisant. Les cotylédons toujours persistants, offrent les nutriments nécessaires aux premiers stades de développement de la plantule (Lippai et al. 1996).

La croissance et le développement allonge la tige et installe les feuilles, les entre-nœuds et les bourgeons axillaires. A l'âge adulte, la plante du marrubie vulgaire exhibe un port dressé, robuste et buissonnant à la base. Durant cette phase, les racines pivotantes et les tiges feuillées se développent et se renforcent. Elles rentrent en période de dormance pendant l'hiver, où leur croissance est ralentie ou arrêtée. Elles reprennent leur croissance au printemps grâce à leur système racinaire persistant.

II.2. Métabolites des plantes

Les végétaux élaborent un grand nombre de métabolites. On y distingue deux types : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Si les métabolites primaires (glucides, acides aminés, lipides, protéines) sont les molécules indispensables à la vie de la plante ; les métabolites secondaires, quant à eux, ne sont pas directement impliqués dans le processus biologique des végétaux. Ils sont construits à partir d'association de molécules simples du métabolisme primaire, généralement par les sucres. Leur rôle n'est pas toujours clairement défini, même si de nombreuses recherches ont permis de démontrer que ce sont des éléments essentiels à la coévolution des plantes avec leur environnement (**Crozier et al. 2006**).

II.2.1. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés dans trois catégories (**Tab. 2**) :

Tableau 2 : Classification des métabolites secondaires (Floareş et al. 2023)	
<i>Alcaloïdes</i>	Composés azotés et comportant au moins un cycle. <i>Exemples</i> : caféine, cocaïne, morphine, etc.
<i>Terpènes</i>	Molécules formées à partir d'unités moléculaires d'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène). <i>Exemples</i> : huiles essentielles, caoutchouc, carotènes, etc.
<i>Composés phénoliques</i>	Caractérisés par au moins un noyau aromatique (molécule cyclique à 6 atomes de carbone) relié à un ou plusieurs groupements hydroxyles (-OH). <i>Exemples</i> : phénols, polyphénols, acides-phénols, flavonoïdes, tannins, etc.

Les composés phénoliques sont présents dans tous les végétaux supérieurs et dans tous les organes d'une plante : tige, racines, feuilles et fleurs. Ils sont responsables à la fois de la couleur, de l'arôme et des propriétés anti-oxydantes des végétaux. Ils englobent une grande variété de molécules hétérogènes qui vont des plus petits acides phénoliques aux gros polymères comme les tannins, en passant par les flavonoïdes et les lignines (**Kumar et al. 2023**).

II.2.1.1. Composés phénoliques simples

Les composés phénoliques simples sont de deux catégories :

- **Phénols simples (C6)** : la molécule contient un seul cycle phénolique. Le composé phénolique le plus simple est le phénol (hydroxybenzène), son groupe hydroxyle (-OH) est lié directement au cycle benzénique. On y trouve également le catéchol (1,2-dihydroxybenzène), l'hydroxyquinone (hydroquinone), l'eugénol et le Gaïacol (**Fig. 5**).

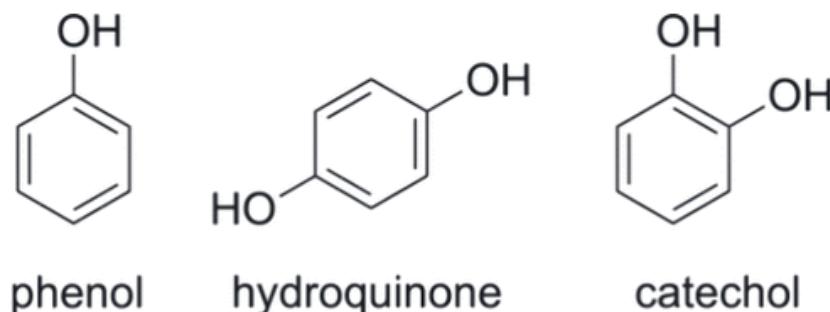


Figure 5 : Structure chimique de quelques exemples de composés phénoliques simples en C6 : phénol (hydroxybenzène), hydroquinone (hydroxyquinone) et catéchol. *Source : Bennett et al. (2024)*.

- **Acides phénols ou acides phénoliques** : ce sont des dérivés hydroxylés soit de l'acide benzoïque C_6H_5COOH (C6-C1) formant alors la classe des acides hydroxybenzoïques ; soit de l'acide cinnamique $C_6H_5-CH=CHCOOH$ (C6-C3) formant alors la classe des acides hydroxycinnamiques. Ils sont très répandus dans le règne des végétaux (**Fig. 6**).

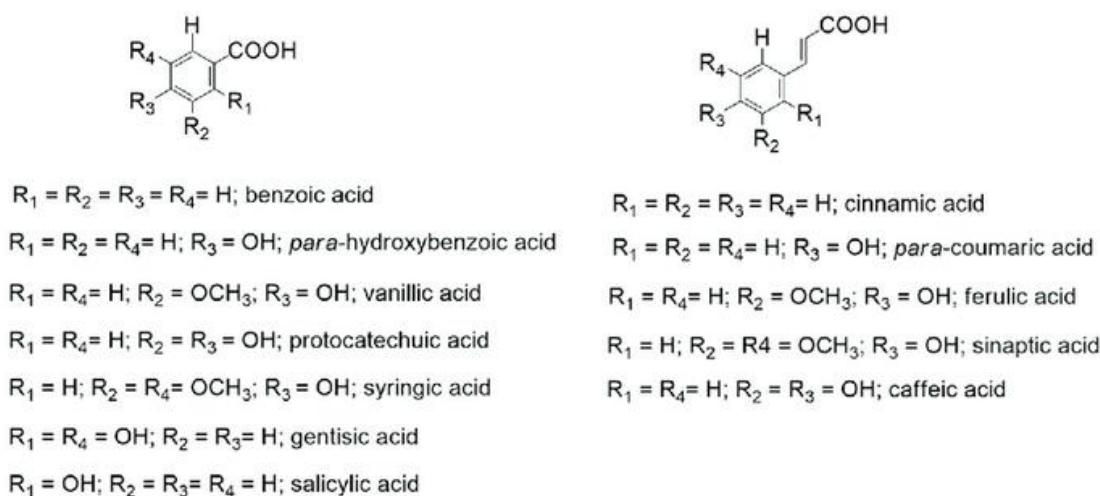


Figure 6 : Monographie des acides phénoliques. *Source : Tommasi (2019)*.

II.2.1.2. Polyphénols

Cette catégorie est représentée par :

- **Coumarines** : ces phénols sont des dérivés hydroxylés de la coumarine simple, qui est une lactone (2H-1-benzopyrane-2-one). Leur squelette carboné est C6-C3.

Les coumarines qui ne sont pas associées à une chaîne organique (coumarines aglycones) portent des groupements méthoxy (-OCH₃) (**Fig. 7**).

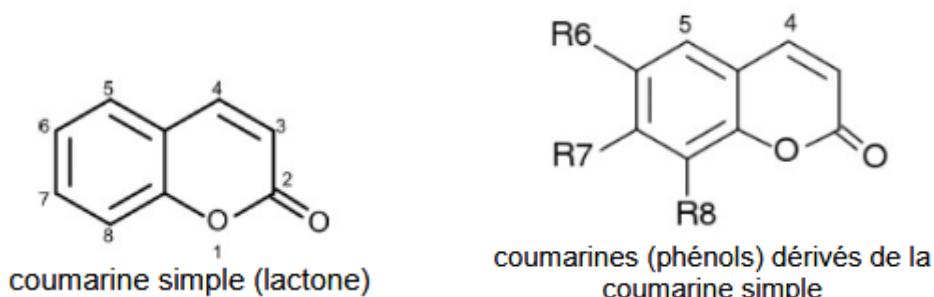


Figure 7 : Structure générale des coumarines aglycones, dérivés hydroxylés de la lactone coumarine. *Source* : Élie (2022).

Mais les coumarines peuvent aussi être la partie aglycone d'un hétéroside, on parle de glucosides de coumarines. Elles peuvent aussi être liées à des terpènes formant la famille des prényloxycoumarines (ou coumarines terpéniques) ou à des composés organiques cycliques, comportant 5 ou 6 atomes de carbone formant ainsi soit des furanocoumarines (cycle de fusion furane), soit des pyranocoumarines (cycle de fusion pyrane).

- **Naphtoquinones (C₆-C₄)** : phénols dérivés de la naphtoquinone (C₁₀H₆O₂), qui est une quinone dérivant du naphtalène. *Exemple* : juglone ou juglandine présent chez le noyer noir. Ses effets biologiques sur les plantes environnantes provoquent leur retard de croissance, c'est pourquoi il est difficile de cultiver des végétaux auprès de cet arbre.

- **Stilbеноïdes (C₆-C₂-C₆)** : phénols dérivés hydroxylés du stilbène (C₁₄H₁₂) qui est un hydrocarbure aromatique. Ils appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes et sont produits dans plusieurs variétés de plantes. Par exemple, ce sont des produits secondaires de la formation du bois de cœur dans les arbres qui peuvent agir comme phytoalexines. Un autre exemple est le resvératrol, un anti-fongique présent dans le raisin et dont on a suggéré qu'il avait des effets bénéfiques sur la santé.

- **Lignanes (C₆-C₃)₂** : résultent de la fusion de 2 phénylpropanoïdes ; leur squelette carboné est (C₆-C₃)₂ où les carbone C sont répartis en deux cycles benzéniques et 6 carbone non aromatiques. Les structures obtenues sont alors assez diversifiées. Les lignanes ont des propriétés anti-oxydantes, ils interagissent avec les enzymes et se lient à certains récepteurs des hormones sexuelles, tels ceux de l'œstrogène.

- **Lignines (C6-C3)_n, n>2** : ce sont un des principaux constituants du bois ($\approx 25\%$) avec la cellulose ($\approx 45\%$) et l'hémicellulose ($\approx 25\%$). Ce sont des polymères associant, de manière irrégulière, trois monomères, les monolignols (**Fig. 8**).

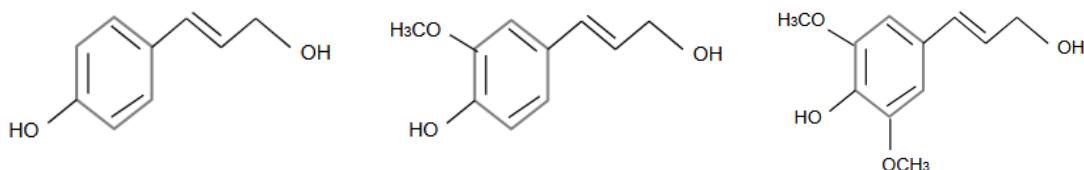


Figure 8 : Unités monolignols (monomères de la lignine). De gauche à droite : alcool p-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapyllique. *Source* : Élie (2022).

Les lignines apportent aux végétaux de la rigidité, en tant que molécules hydrophobes, de l'imperméabilité à l'eau et procurent une résistance à l'implosion des cellules, par baisse de pression, qui participent à la circulation de la sève brute (Élie, 2022).

- **Flavonoïdes (C6-C3-C6)** : leur squelette carboné est formé de 2 cycles benzéniques C6 liés par un pont à 3 atomes de carbone C3. Ils représentent à eux seuls la moitié des composés phénoliques. Ils sont parfois libres, mais majoritairement sous forme d'hétérosides, dont le groupement réducteur est lié à l'oxygène O issu d'une des fonctions hydroxyle –OH, ou bien à l'aglycone par un carbone C. Ils sont classés selon leur structure (**Fig. 9**).

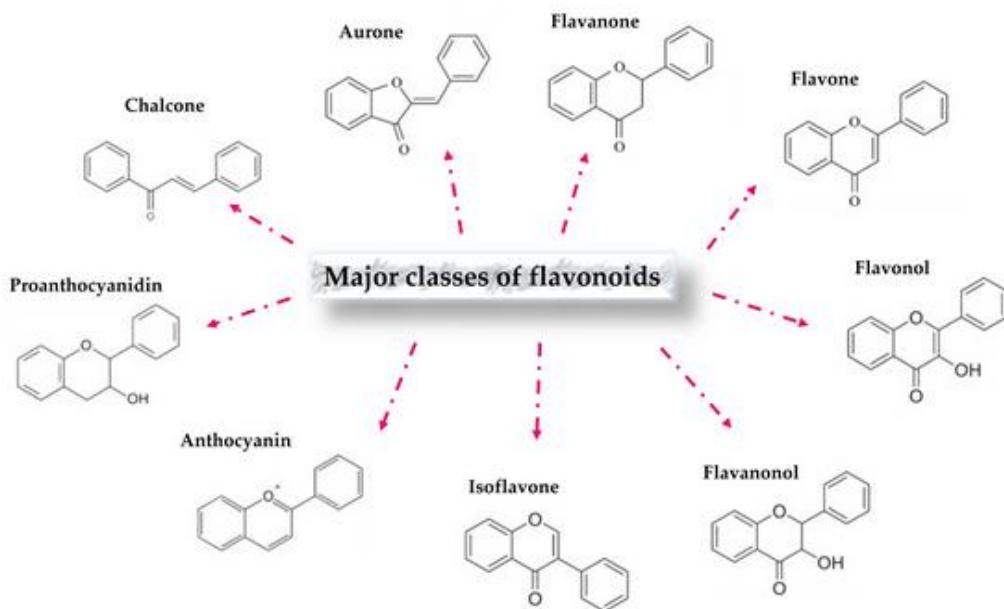
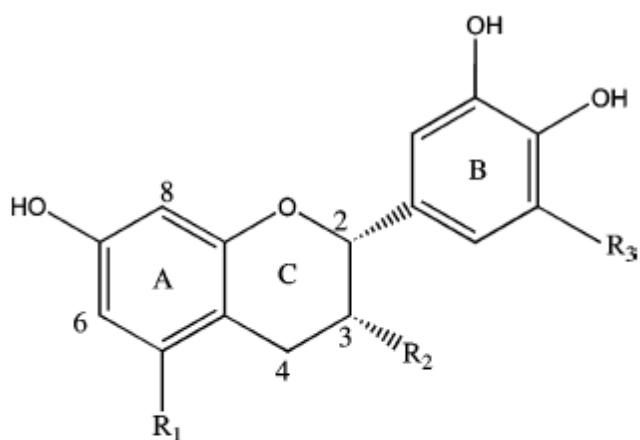


Figure 9 : Structures chimiques des principales classes de flavonoïdes. *Source* : Kuljarusnont et al. (2024).

Ils sont impliqués dans une fonction de protection contre les rayonnements et contre les stress (**Kumar et al. 2023**). Ce sont également des molécules très actives impliquées en phytothérapie, recommandées dans toutes les maladies dites de civilisation et contre les effets du vieillissement (**Sagorin et al. 2021**).

- **Tannins condensés (C6-C3-C6)_n** : ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols ou proanthocyanidines. Ce sont des polymères de flavanols, une sous-classe des flavonoïdes, dont la structure chimique est basée sur un système d'hétérocycles.

Selon la nature des unités monomériques des flavanols, on distingue 2 types de tannins condensés : les procyanidines et les prodelphinidines (**Fig. 10**).



R ₁	R ₃	Class
OH	H	Proanthocyanidin
OH	OH	Prodelphinidin
H	H	Profisetinidin
H	OH	Prorobinetinidin

Figure 10 : Unité répétitive de base des tannins condensés. *Source : Schofield et al. (2001)*.

Les proanthocyanidols, en milieu acide et température élevée, se dégradent généralement en anthocyanidols. Les additions successives d'unités flavanols peuvent générer des polymères formées d'un nombre important de monomères. Exemple, les proanthocyanidols présents dans les pépins de raisin sont composés de 18 unités flavanol. Un degré de polymérisation élevé (nombreuses unités monomères) diminue la solubilité du composé.

Les proanthocyanidols peuvent bloquer les radicaux libres et sont de puissants anti-oxydants. Ils présentent un intérêt dans le traitement de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et dans la cicatrisation (**Gourlay et al. 2022**).

II.2.2. Autres métabolites

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit de peroxydation des lipides, tandis que la vitamine C (acide ascorbique) est un antioxydant. Il existe une relation inverse entre les deux : lorsque le stress oxydatif augmente, la production de MDA augmente, et la vitamine C, en tant qu'antioxydant, peut aider à réduire la production de MDA.

II.2.2.1. Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde ou aldéhyde malonique est un composé chimique de formule $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. La structure de cette espèce chimique est cependant plus complexe que ce que sa formule pourrait laisser penser, car elle est en fait constituée de 2 mésomères en résonance entre lesquels la forme énolique prédomine sur la forme dialdéhyde (**Fig. 11**) (Nair et al. 2008).

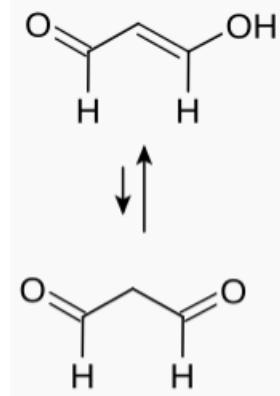


Figure 11 : Mésomères du malondialdéhyde où la forme énolique (HOHC=CH-CHO) prédomine sur la forme dialdéhyde ($\text{OCH-CH}_2\text{-CHO}$).

Le MDA est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés.

En effet, les formes réactives de l' O_2 comme les radicaux hydroxyles HO^\cdot , attaquent par peroxydation lipidique les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines. A côté des radicaux peroxydes lipidiques (RO_2^\cdot), des radicaux alkoxydes (RO^\cdot) peuvent être produits, en présence de Fe^{2+} , à partir des hydroperoxydes lipidiques. Ces radicaux très oxydants participent à la propagation des réactions de peroxydation lipidique en chaîne, conduisant à une diminution de la fluidité des membranes (**Fig. 12**).

L'aboutissement ultime du processus de dégradation conduit à la formation du MDA, considéré comme un marqueur d'un stress oxydant sévère.

Des radicaux RO_2^\cdot (peroxydes) et RO^\cdot (alkoxydes) sont aussi formés lors des réactions d'oxydation des chaînes polypeptidiques constitutives des protéines (Dizengremel, 2023).

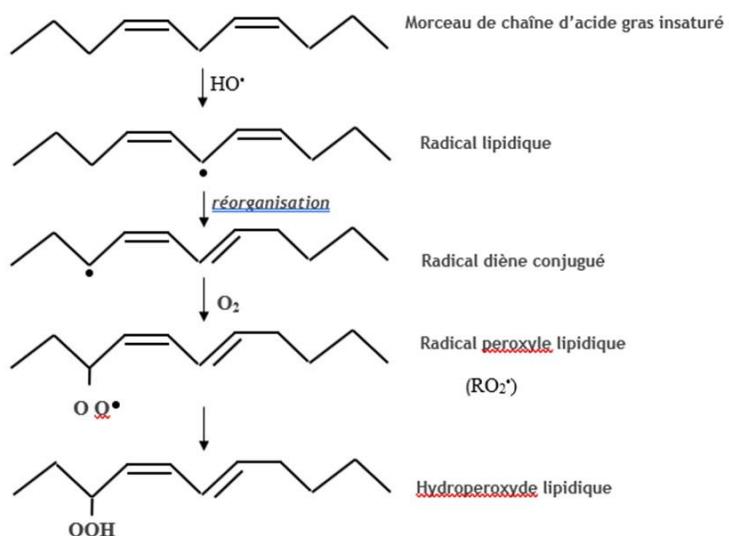


Figure 12 : Peroxydation des chaînes d'acides gras polyinsaturés par le radical HO^\cdot .
Source : Dizengremel (2023).

II.2.2.2. Acide ascorbique

La vitamine C est un acide organique dont la structure est apparentée à celle des sucres à 6 atomes de carbone ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Dans la plante, l'acide ascorbique est principalement présent sous sa base conjuguée : L-ascorbate. Il constitue la forme réduite de la vitamine C et peut être oxydé en monodéhydroascorbate, puis en déhydroascorbate (Fig. 13).

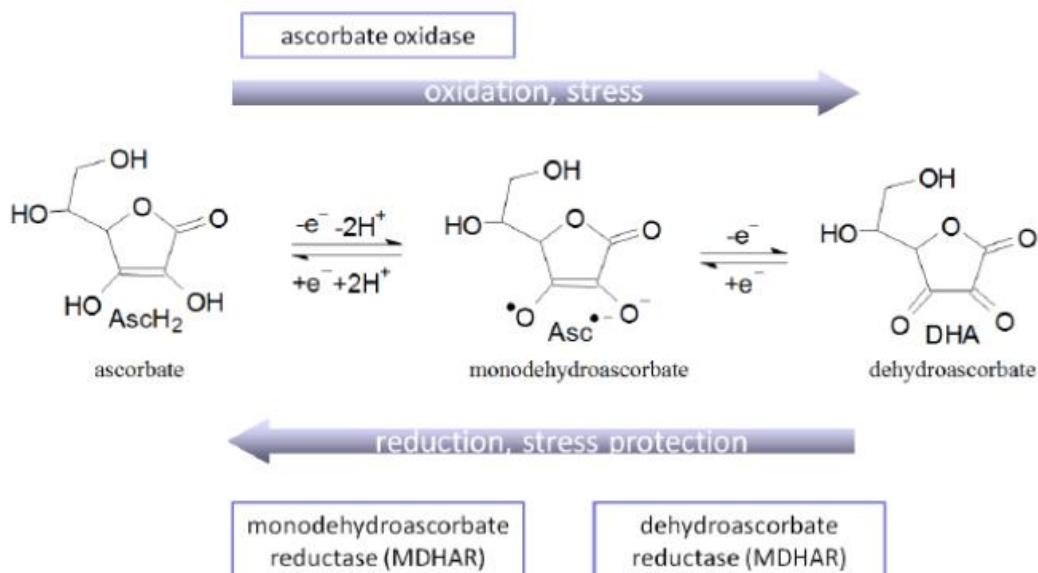


Figure 13 : Structure de l'ascorbate et de ses dérivés monodéhydroascorbate et déhydroascorbate. Ces transitions sont liées à des facteurs stressants ou à l'activité d'enzymes. Source : Truffault et al. (2014).

L'acide ascorbique peut être synthétisé par différentes voies : L-galactose, myo-inositol, L-gulose et par voie de récupération des polysaccharides pariétaux. La principale étant la voie du L-galactose (Wheeler et al. 1998).

Les teneurs en vitamine C des fruits et des légumes sont variables selon les genres ou les espèces. Cette variabilité est également fonction de l'organe, du tissu et au sein même de la cellule entre les différents compartiments. Ainsi, elle est accumulée de manière importante dans les chloroplastes où elle peut atteindre 30-40% de la quantité totale de vitamine C de la cellule d'une feuille. Cette forte accumulation est en relation avec l'un des rôles principaux de l'ascorbate qui est la détoxicification des espèces réactives de l'oxygène produites par le métabolisme cellulaire (Fig. 14) (Foyer & Noctor, 2009).

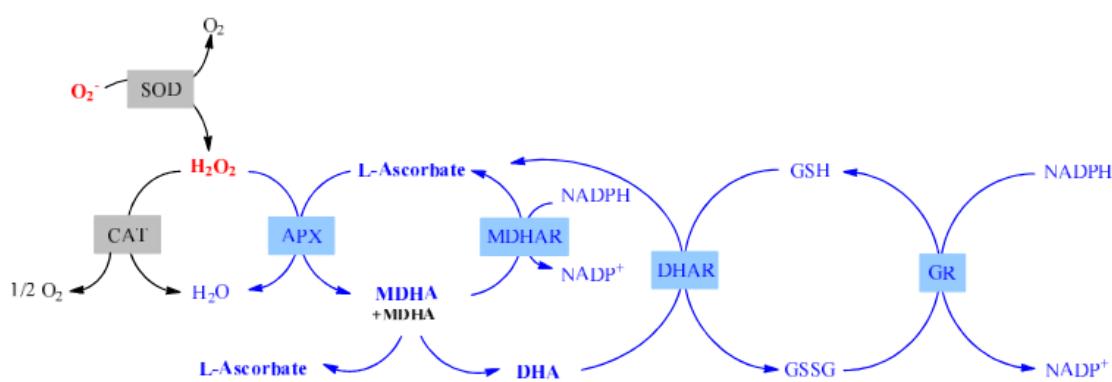


Figure 14 : Détoxication des formes actives de l'oxygène par le cycle ascorbate / glutathion (en bleu) et l'action des enzymes SOD (supéroxyde dismutase) et CAT (catalase) (en noir).
Source : Foyer & Noctor (2009).

Lors du cycle ascorbate/glutathion, l'APX (ascorbate peroxydase) utilise l'ascorbate comme donneur d'électrons pour réduire l' H_2O_2 en eau et produit du MDHA (monodéhydroascorbate). Le MDHA est soit dissocié en ascorbate et DHA (déhydroascorbate), soit réduit en ascorbate par la MDHAR (réductase). Le DHA peut être lui aussi réduit en ascorbate par la DHAR (réductase), une enzyme dépendante de l'oxydation du glutathion. Enfin, le glutathion oxydé (glutathion disulfide, GSSG) est de nouveau réduit en glutathion (GSH) par la glutathion réductase (GR) (Fig. 14).

*MATÉRIEL &
MÉTHODES*

III. Matériel & Méthodes

III.1. Matériel

III.1.1. Collecte des feuilles

Les feuilles de *Marrubium vulgare* L. ont été collectées au mois de décembre 2024 et au mois de mars 2025 au niveau de la région d'El-Mizab, dans la commune de Draâ-El-Kaïd, à Kherrata, au sud-est du chef-lieu de la Wilaya de Bejaia (**Fig. 15 & Tab. 3**).

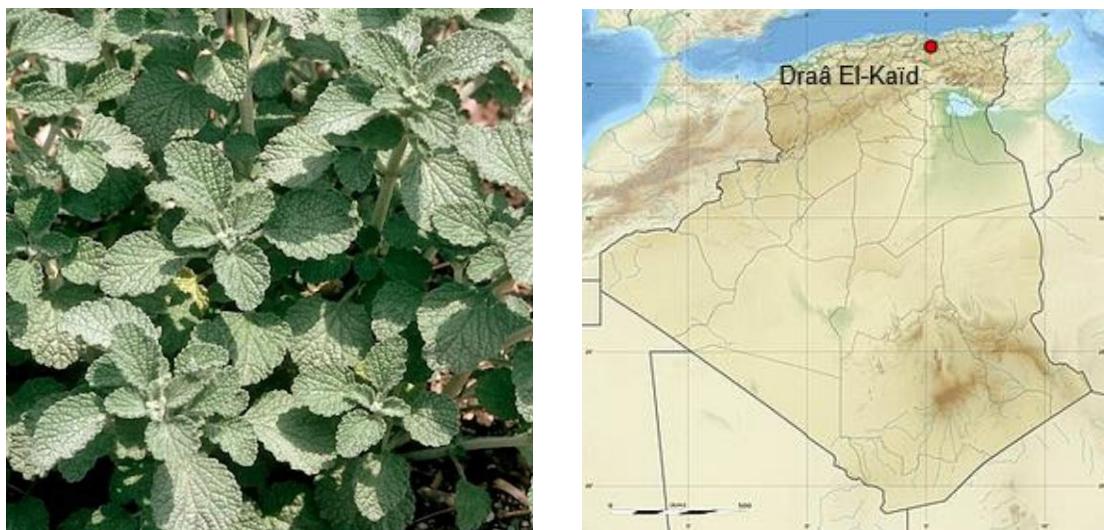


Figure 15 : Feuilles de *Marrubium vulgare* L. et leur lieu de récolte dans la région d'El-Mizab, à Draâ-El-Kaïd, au sud-est de Bejaia.

Tableau 3 : Coordonnées géographiques et climat de Draâ-El-Kaïd

Latitude	36.4205°N
Longitude	5.2245°E
Coordonnées	36° 25' 14" Nord, 5° 13' 28" Est
Superficie	120,16 Km ²
Altitude	867 m
Climat	Climat méditerranéen avec été chaud (<i>Classification de Köppen</i>)

III.1.2. Préparation des échantillons

Dès récolte, les feuilles de *Marrubium vulgare* L. sont lavées à l'eau pour éliminer les impuretés et poussières, puis égouttées, avant d'être étalées sur du papier absorbant pour sécher. Le séchage a duré une quinzaine de jours dans un endroit sec, à l'abri du soleil et à température ambiante. Les feuilles complètement desséchées sont réduites en poudre, puis sont finement tamisées par les cibles d'un tamis de 2 mm (**Fig. 16**).



Figure 16 : Préparation de poudres finement tamisées obtenues de feuilles desséchées de *Marrubium vulgare* L.

III.2. Méthodes

Toutes les méthodes décrites ci-dessous sont appliquées aux poudres tamisées obtenues depuis les feuilles desséchées et broyées de *Marrubium vulgare* L.

III.2.1. Extraction et dosage des polyphénols totaux

III.2.1.1. Principe

La quantité en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon ce qui a été décrit par **Singleton & Rossi (1965)**. Le réactif utilisé étant formé d'acide phosphotungstique ($H_3[P(W_3O_{10})_4] \times H_2O$) auquel on rajoute de l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Cette préparation est réduite lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Le changement de couleur obtenu, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot and Charpentier, 2006**).

III.2.1.2. Extraction

L'extraction des polyphénols totaux est effectuée sur des feuilles desséchées réduites en poudre (0,1 g) homogénéisées par 5 mL de méthanol (80%). Le mélange est agité puis centrifugé pendant 20 mn à 3500 rpm.

III.2.1.3. Dosage

À une partie aliquote (200 μ L dilué à 1/4) de l'extrait, on y ajoute 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (1N dilué à 0,1N). Après agitation, le mélange est incubé 5 mn à l'obscurité avant

d'ajouter 800 μ L de carbonate de sodium (Na_2CO_3 – 7,5%). Après agitation et 5 mn d'incubation à 50°C et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm au spectrophotomètre (*Biotech VIS-7220G*). L'étalonnage du spectrophotomètre est réalisé par un blanc constitué de 200 μ L de méthanol 80% et 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu.

III.2.1.4. Courbe étalon

La courbe étalon est réalisée à l'aide d'une solution mère d'acide gallique à 0,2 mg/mL. Les dilutions préparées varient de 0 à 0,07 mg/mL (**Fig. 17**). Le contenu total en polyphénols (TPC) sera exprimé en mg équivalents d'acide gallique par g de matière végétale sèche (mg EAG/g de MVS). C'est la moyenne de 6 essais différents pour chacune des 2 récoltes.

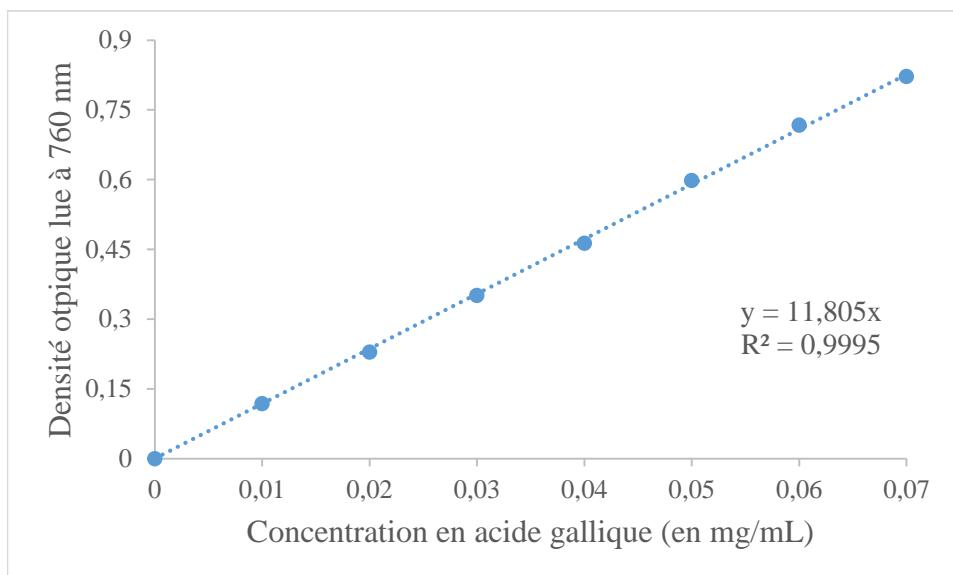


Figure 17 : Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère d'acide gallique à 0,2 mg/mL (densité optique lue à $\lambda = 760$ nm).

III.2.2. Extraction et dosage des flavonoïdes totaux

III.2.2.1. Principe

L'une des méthodes les plus répandues pour déterminer la teneur en flavonoïdes est l'essai colorimétrique au chlorure d'aluminium, où l'Al(III) est utilisé comme agent complexant. La méthode est basée sur la formation de chélates d'Al(III) – flavonoïdes. En raison de leurs nombreux groupements oxo et hydroxyle, les flavonoïdes ont une grande affinité pour lier les ions métalliques de l'Al(III), souvent dans un rapport 1/1, en fonction des conditions expérimentales (**Christ and Muller, 1960**). Cette méthode a été améliorée avec le temps où la complexation Al(III) - flavonoïde se réalise en présence d'un sel d'acétate (**Shraim et al. 2021**).

III.2.2.2. Extraction

Comme pour les polyphénols totaux, l'extraction des flavonoïdes totaux s'est déroulée sur les feuilles desséchées réduites en poudre (0,1 g) homogénéisées par 5 mL de méthanol (80%). Le mélange a été agité puis centrifugé pendant 20 mn à 3500 rpm.

III.2.2.3. Dosage

La quantité en flavonoïdes totaux est déterminée en utilisant un dosage colorimétrique mis au point par **Surana et al. (2016)**. Une partie aliquote (250 µL) de l'extrait de l'échantillon est mélangée tour à tour avec 750 µL d'éthanol, 50 µL de chlorure d'aluminium (10% dans du méthanol), 50 µL d'acétate de potassium (1 M dans l'éthanol) et 1,4 mL d'H₂O distillée. L'ensemble est fortement homogénéisé au vortex puis mis à incuber pendant 40 mn à l'obscurité et à température ambiante du laboratoire. Après incubation, l'absorbance est lue au spectrophotomètre (*Biotech VIS-7220G*) à une longueur d'onde de 415 nm contre un blanc échantillon où le chlorure d'aluminium est remplacé par de l'eau distillée.

III.2.2.4. Courbe étalon

La courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de quercétine à 0,1 mg/mL préparée dans l'éthanol. Les dilutions préparées varient de 0 à 0,1 mg/mL (Fig. 18). De là, on détermine la quantité en flavonoïdes totaux, une valeur moyenne de 6 essais et qui sera exprimée en mg équivalents quercétine par g de matière végétale sèche (mg EQ/g de MVS).

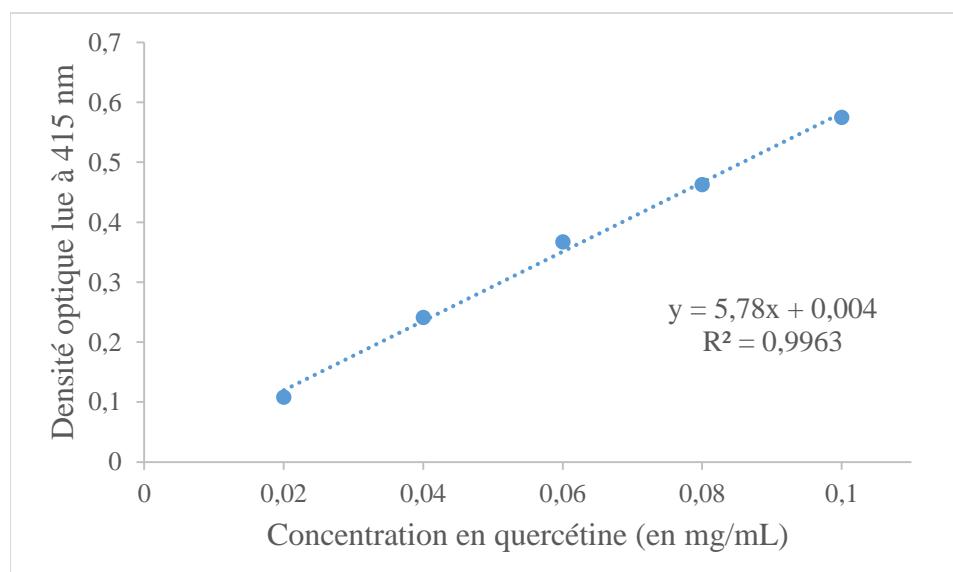


Figure 18 : Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère de quercétine à 0,1 mg/mL (densité optique lue à $\lambda = 415$ nm).

III.2.3. Extraction et dosage des tannins condensés

III.2.3.1. Principe

Les tannins condensés ont été estimés par une méthode colorimétrique en utilisant de la vanilline. Elle est basée sur la réaction des tannins condensés avec la vanilline en produisant un complexe coloré (**Fig. 19**).

Cette réaction en milieu acide est spécifique de manière générale aux flavonols. La vanilline réagit avec les monomères catéchiques et les unités terminales des proanthocyanidines pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500 nm. Elle ne réagit pas avec les unités intermédiaires des proanthocyanidines car son site de fixation (carbone 6) est pris dans la liaison monomère - monomère C4-C6 des tanins condensés (**Schofield et al. 2001**).

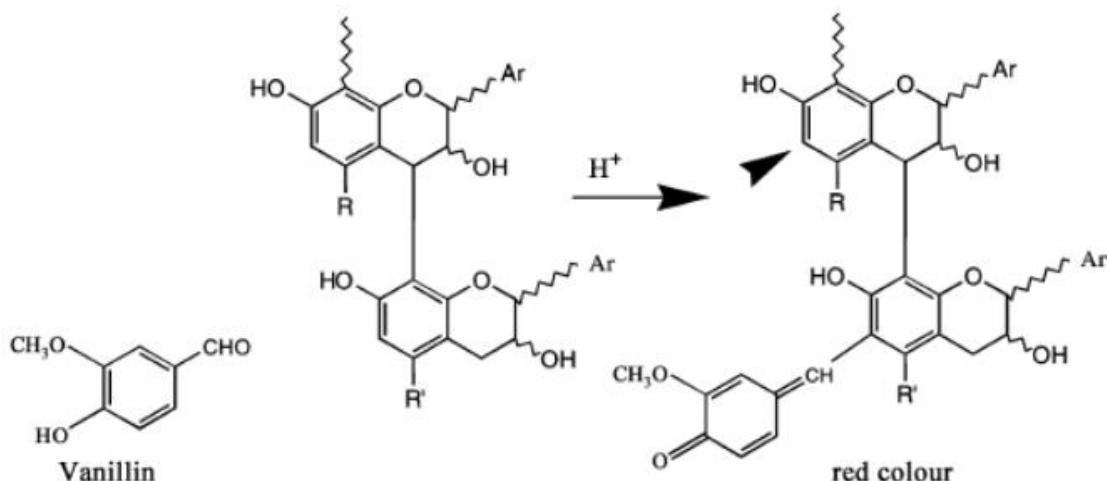


Figure 19 : Réaction entre vanilline et tannins condensés avec formation d'un complexe rouge. La flèche indique un second site réactif. *Source : Schofield et al. (2001)*.

III.2.3.2. Extraction

Tout comme pour les polyphénols et les flavonoïdes totaux, l'extrait pour le dosage des tanins condensés est obtenu depuis les feuilles desséchées réduites en poudre (0,1 g), homogénéisées avec 5 mL de méthanol (80%). Le mélange a été agité au vortex puis centrifugé pendant 20 mn à 3500 rpm.

III.2.3.3. Dosage

Les tanins condensés ont été dosés selon la méthode décrite par **Julkunen-Titto (1985)**. Une partie aliquote (250 μ L) de l'extrait de l'échantillon diluée à 1/5 est mélangée avec 1,5 mL de la solution vanilline – méthanol à 4% et 750 μ L d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange obtenu est vortexé puis laissé réagir à température ambiante pendant 15 mn à

température ambiante. L'absorbance est mesurée à 500 nm au spectrophotomètre (*Biotech VIS-7220G*) contre un blanc formé de 250 µL de méthanol, de 1,5 mL de la solution vanilline – méthanol à 4% et 750 µL d'acide chlorhydrique concentré.

III.2.3.4. Courbe étalon

La courbe étalon est réalisée à l'aide d'une solution mère de catéchine à 1 mM préparée dans du méthanol. Les dilutions préparées varient de 0 à 1 mM par échelle croissante de 0,2 mM. Ces valeurs ont été converties en mg/mL (1 mM = 1000 µmol/L correspondant à 290,26 µg/mL) (Fig. 20).

La quantité en tannins condensés, moyenne de 6 essais sera exprimée en mg équivalent catéchine / g de matière végétale sèche.

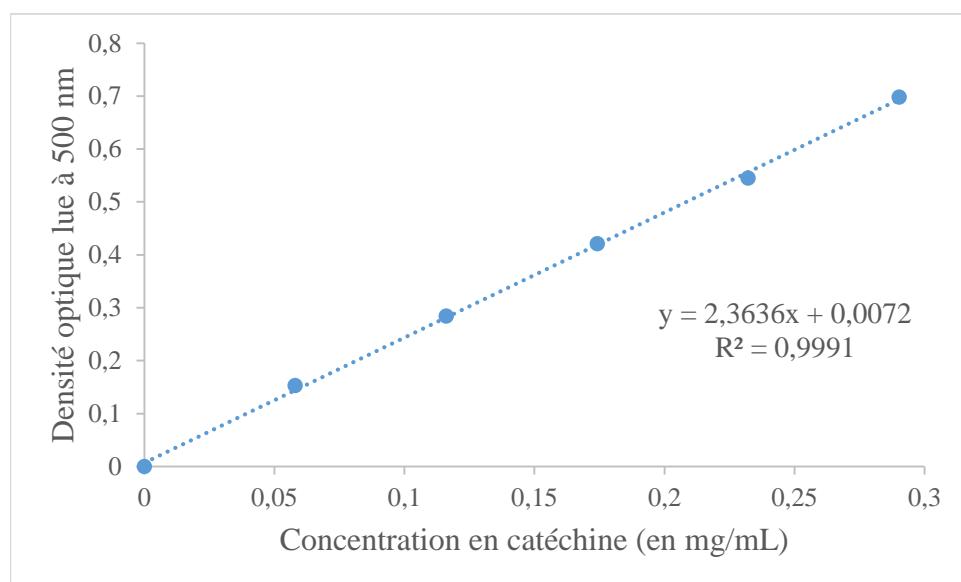


Figure 20 : Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère de catéchine à 1 mM (densité optique lue à $\lambda = 500$ nm).

III.2.4. Extraction et dosage de l'acide ascorbique

III.2.4.1. Principe

Le DCPIP ou 2,6-dichloro-phénol-indophénol est utilisé pour doser directement l'acide ascorbique présent en solution acide. La réaction entre le DCPIP et l'acide ascorbique (vitamine C) est une réaction redox. Le DCPIP, qui est bleu en solution, est réduit par l'acide ascorbique, ce qui le rend incolore. En équation, cela se traduit par (Fig. 21) :

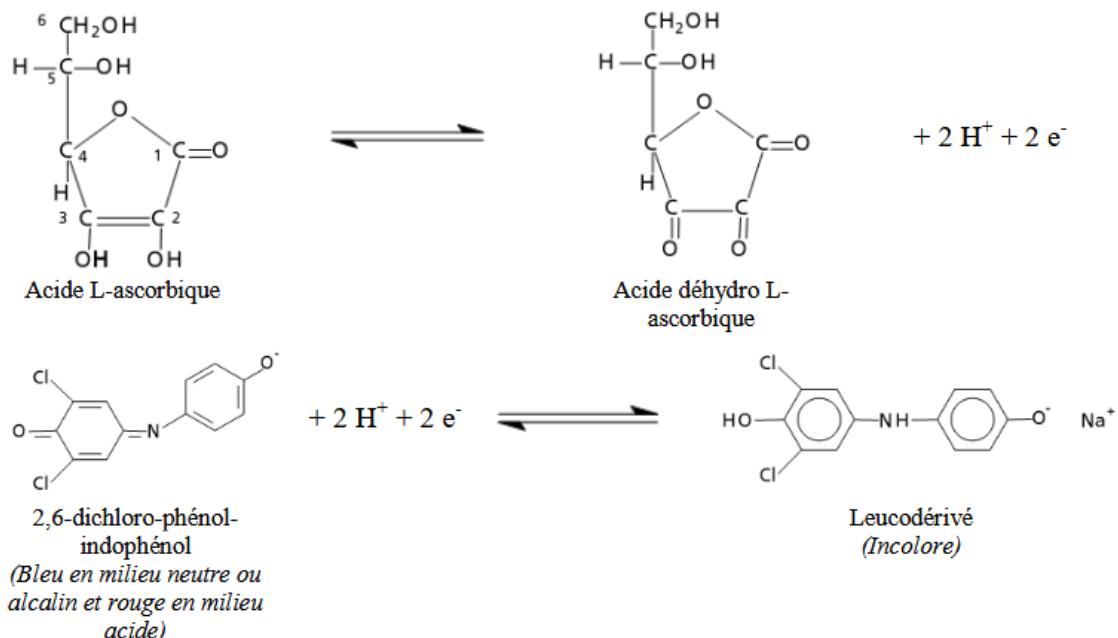


Figure 21 : L’acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique, et le DCPIP est réduit. Ce dernier est un indicateur redox, il est bleu lorsqu’il est oxydé et incolore lorsqu’il est réduit. L’acide ascorbique agit comme réducteur, il provoque la réduction du DCPIP. Cette réaction redox implique un transfert d’électrons, l’acide ascorbique cédant des électrons au DCPIP. Cette réaction est utilisée pour doser l’acide ascorbique dans des solutions, car la quantité de DCPIP réduite est directement liée à la quantité d’acide ascorbique présente. http://girault.benjamin.free.fr/Docs/bts_diet/tp_bioch/vitC_DCPIP.pdf

III.2.4.2. Extraction

Sur une plaque agitatrice, on place dans un bécher 0,2 g de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. auquel on rajoute 10 mL d’acide oxalique à 3% préparé dans de l’eau distillée. Ce mélange reste sous agitation durant 30 mn à température ambiante du laboratoire. Le mélange est récupéré en tube Falcon et centrifugé pendant 10 mn à 5000 rpm.

III.2.4.3. Dosage

La teneur en acide ascorbique est déterminée selon la méthode légèrement modifiée de **Klein & Perry (1982)**. Une partie aliquote (200 μL) de la solution est mélangée avec 2 mL de DCPIP préparé à 143 μM . Le mélange obtenu est instantanément lu au spectrophotomètre à une longueur d’onde de 515 nm contre un blanc formé de 200 μL d’acide oxalique et 2 mL d’eau distillée ; quant au contrôle, il est constitué de 200 μL d’acide oxalique et 2 mL de DCPIP préparé à 143 μM .

III.2.4.4. Courbe étalon

La courbe étalon est réalisée à l'aide d'une solution mère d'acide ascorbique à 1 mg/mL préparé dans l'acide oxalique à 3%. Les dilutions préparées varient de 0 à 0,1 mg/mL par échelle croissante de 0,025 mg/mL (**Fig. 22**).

La quantité en acide ascorbique, moyenne de 6 essais sera exprimée en mg équivalent acide ascorbique / g de matière végétale sèche.

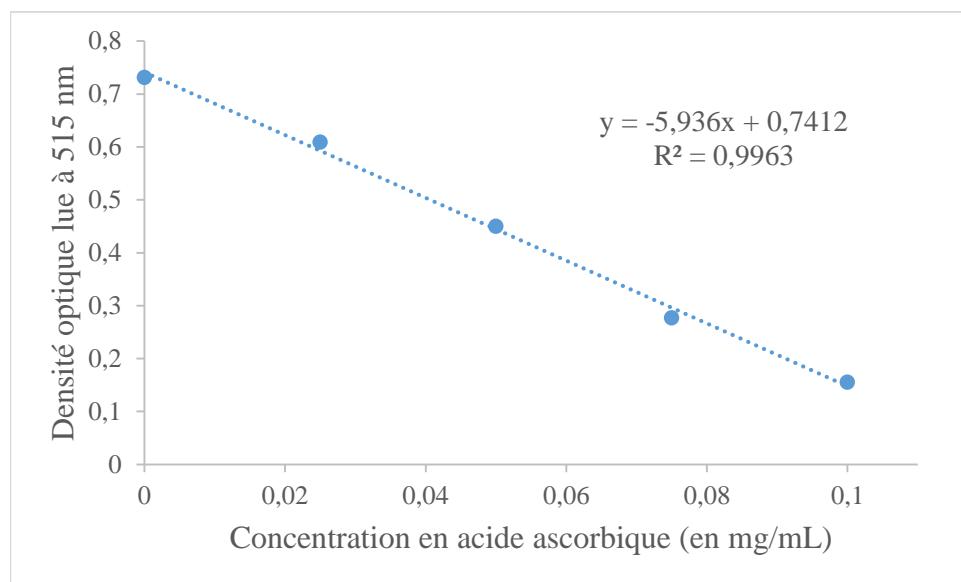


Figure 22 : Courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution mère d'acide ascorbique à 1 mg/mL (densité optique lue à $\lambda = 515$ nm).

III.2.5. Extraction et dosage du malondialdéhyde (MDA)

III.2.5.1. Principe

La peroxydation lipidique est mesurée par quantification du MDA, un produit qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par les espèces réactives de l'oxygène.

Une molécule de MDA en milieu acide et à chaud se condense avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde $\lambda = 532$ nm (**Ohkawa et al. 1979**).

Cette technique qui présente d'excellentes qualités sur le plan de la sensibilité, manque toutefois de spécificité à cause des interférences avec les molécules qui ne relèvent pas du stress oxydant mais réagissant avec le TBA (**Fig. 23**).

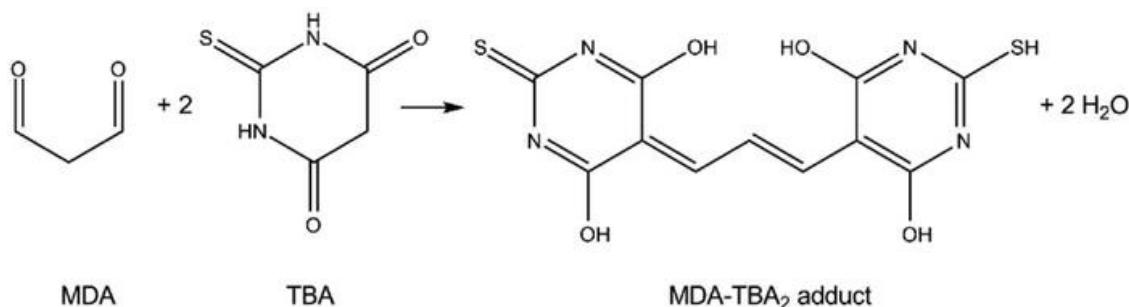


Figure 23 : Réaction du malondialdéhyde (MDA) avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique formant un complexe rose MDA-TBA₂. *Source* : Weitner et al. (2016).

III.2.5.2. Extraction et dosage

Peser environ 0,1 g de matière végétale sèche qu'on reprend dans 1,5 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 1%. Après une agitation au vortex, le mélange est centrifugé durant 20 mn à 6000 rpm.

De l'extrait, on prélève 500 µL auquel on rajoute 2 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,5% (préparé dans le TCA à 20%). Après agitation, ce mélange est incubé pendant 30 mn au bain-marie à 95°C.

Après refroidissement, la lecture des densités optiques s'effectue à 532 et à 600 nm. La lecture de la densité optique à 600 nm sert à déduire l'absorption due à d'autres substances autres que le MDA-TBA₂.

III.2.5.3. Calculs

La quantité en malondialdéhyde (MDA) est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire du MDA ($\epsilon = 155 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). La quantité en MDA est la moyenne de 6 essais différents et sera exprimée en $\mu\text{g/g}$ de matière végétale sèche.

III.2.6. Etude statistique

Les résultats présentés expriment pour l'ensemble dans analyses une valeur moyenne de 6 répétitions \pm écart-type. L'ensemble des paramètres étudiés ont été soumis à une analyse de la variance de tous les effets et le test LSD pour les comparaisons post-hoc ($P=0,05$). Ces analyses ont été effectuées avec Statistica 5.5 (StatSoft 1999).

RÉSULTATS & DISCUSSION

IV. Résultats & Discussion

IV.1. Résultats

IV.1.1. Composés phénoliques totaux

Le contenu total en composés phénoliques dosé dans les échantillons de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées au mois de décembre ($14,45 \pm 0,45$ mg EGA/g de MVS) est de 1,53 fois plus élevé que celui qui a été dosé dans les échantillons de feuilles récoltées au mois de mars ($9,43 \pm 0,44$ mg EGA/g de MVS) (Fig. 24).

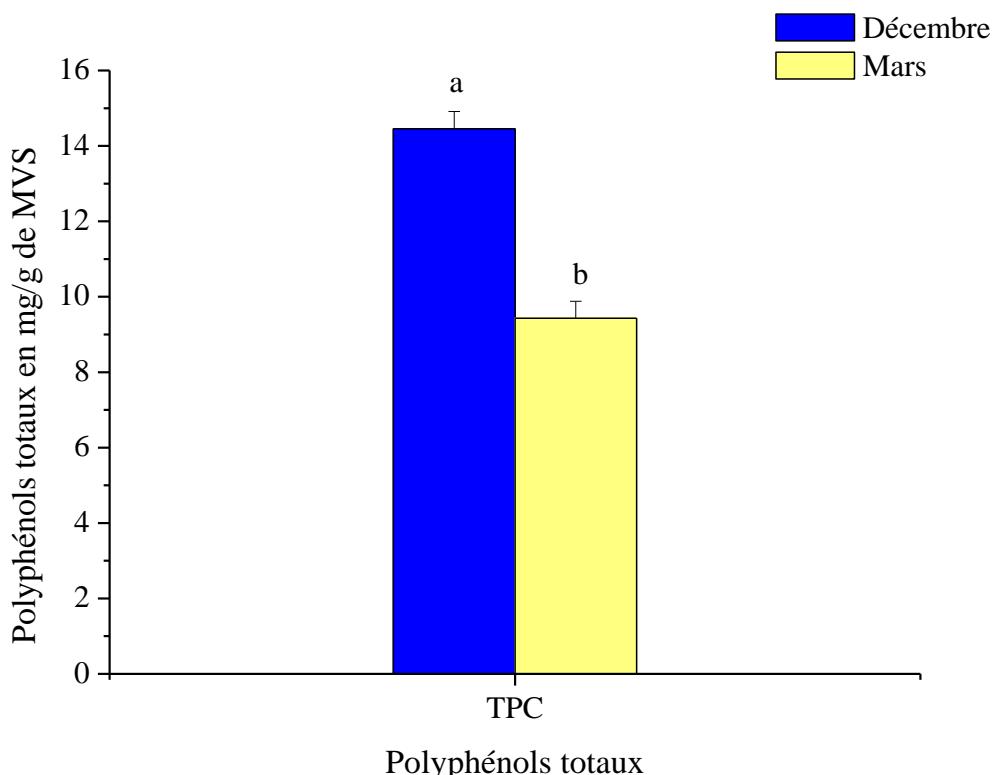


Figure 24 : Evolution du contenu moyen en composés phénoliques totaux (équivalent en acide gallique) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). Les différentes lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha = 0,05$.

IV.1.2. Flavonoïdes totaux

Tout autant que pour les composés phénoliques totaux, le dosage effectué pour déterminer la quantité en flavonoïdes totaux a donné lieu à des différences significatives entre le contenu en flavonoïdes totaux des échantillons de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées au mois de décembre par rapport aux échantillons de feuilles récoltées au mois de mars (Fig. 25).

En effet, les dosages ont donné lieu à des quantités plus importantes de 1,56 fois au profit du contenu en flavonoïdes totaux dosé au mois de décembre ($2,50 \pm 0,15$ mg EQ/g de MVS) par rapport à celui du mois de mars ($1,60 \pm 0,07$ mg EQ/g de MVS) (Fig. 25).

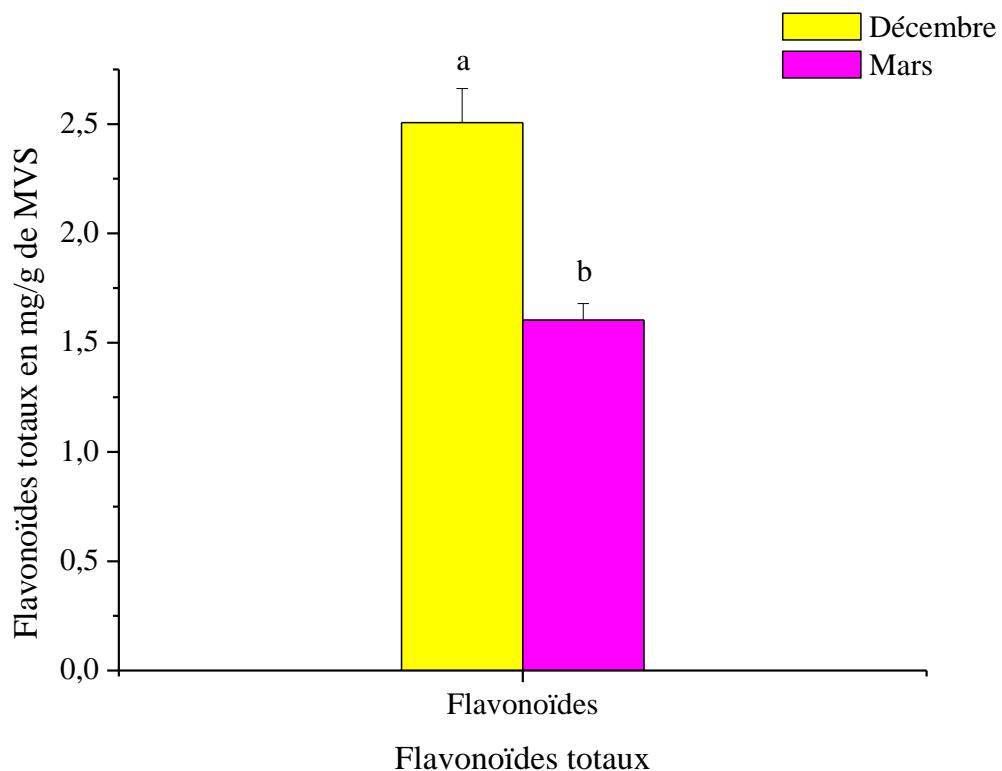


Figure 25 : Evolution du contenu moyen en flavonoïdes totaux (équivalent en quercétine) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). Les différentes lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha = 0,05$.

Un comparatif a été établi entre contenu en composés phénoliques totaux avec celui en flavonoïdes totaux par rapport aux deux périodes de récoltes distinctes (Tab. 4). L’analyse de ce tableau donne lieu aux constatations suivantes :

- Comme déjà observé (Fig. 24 & 25), les quantités respectivement en composés phénoliques et en flavonoïdes obtenues en décembre surpassent celles du mois de mars de 1,5 fois. Les pourcentages différentiels entre les deux périodes de récoltes sont de l’ordre approximativement de 35%. Ce différentiel est par ailleurs identique entre composés phénoliques totaux (34,76%) et flavonoïdes totaux (36,00%).

- Par ailleurs, le pourcentage différentiel entre composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux pour chacun des mois de récolte est approximativement de 83% ; il est au profit des composés phénoliques qui surpassent de loin les flavonoïdes totaux. De même, ce pourcentage différentiel est identique entre les récoltes effectuées au mois de décembre (82,69%) et au mois de mars (83,03%).
- Les rapports établis entre les deux périodes distinctes de récoltes des échantillons de feuilles (Décembre / Mars) par rapport au différentiel entre composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux donnent un rapport de 1 ($1,53/1,56 = 34,76/36,00$).
- C'est aussi le même constat lorsqu'on considère le rapport du pourcentage différentiel entre composés phénoliques / flavonoïdes par rapport au rapport des deux périodes de récolte (Décembre / Mars), qui donne également un rapport égal à 1 (82,69/83,03).
- En conclusion, l'évolution des composés phénoliques totaux est identique à celle observée pour les flavonoïdes totaux entre les deux périodes de récolte.

Tableau 4 : Composés phénoliques totaux (TPC) vs flavonoïdes totaux (FT)

	TPC (mg EGA / g MVS)	FT (mg EQ / g MVS)	TPC / FT % différentiel
<i>Décembre</i>	14,45	02,50	82,69 %
<i>Mars</i>	09,43	01,60	83,03 %
Rapports			0,99
<i>Décembre / Mars</i>	1,53	1,56	0,98
<i>% différentiel entre décembre et mars</i>	34,76 %	36,00 %	0,96

IV.1.3. Tannins condensés

Au même titre que pour les composés phénoliques totaux ainsi que pour les flavonoïdes totaux, le contenu en tannins condensés des échantillons de feuilles de *Marrubium vulgare* L. a été également déterminé par rapport aux deux périodes distinctes de récolte. Ainsi, la quantité dosée au niveau des échantillons de feuilles de la récolte du mois de décembre est de $20,08 \pm 1,03$ mg EC/g de MVS. Elle significativement différente de celle dosée au niveau des échantillons de feuilles prélevés au mois de mars ($12,75 \pm 0,97$ mg EC/g de MVS) et surtout supérieure de 1,57 fois au profit de la récolte du mois de décembre (**Fig. 26**).

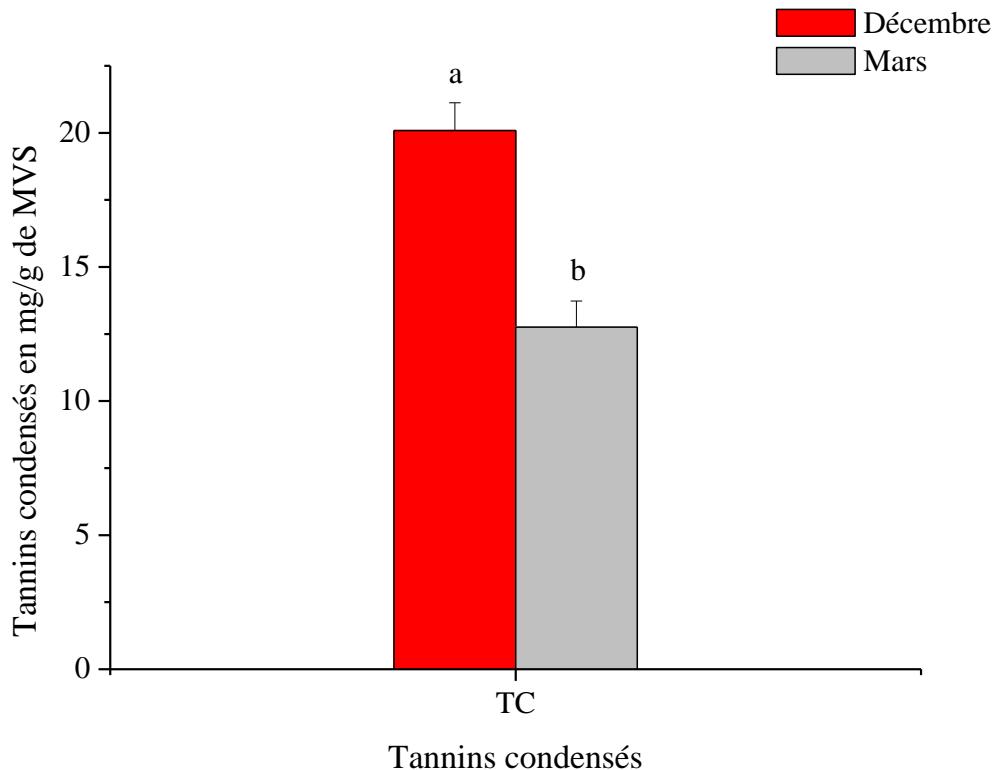


Figure 26 : Evolution du contenu moyen en tannins condensés (équivalent en catéchine) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). Les différentes lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha = 0,05$.

Une comparaison est établie entre le contenu en tannins condensés vis-à-vis de la somme des contenus en composés phénoliques et flavonoïdes totaux par rapport aux deux périodes de récoltes distinctes (**Tab. 5**). Les points les plus importants sont :

- Comme initialement rapporté dans les cas des composés phénoliques totaux et même des flavonoïdes totaux qui sont en terme du contenu plus abondants au mois de décembre qu'au mois de mars, on constate que les tannins condensés sont aussi plus abondants dans les échantillons du mois de décembre que dans les échantillons du mois de mars (**Fig. 26 & Tab. 5**). Le pourcentage différentiel entre ces deux mois de récolte étant de 36,50% pour les tannins condensés, comme d'ailleurs celui des composés phénoliques totaux (34,76%) et des flavonoïdes totaux (36,00%) pris séparément ou bien considérés ensemble (34,92%).

- Que ce soit au mois de décembre ou au mois de mars, le contenu en tannins condensés surpassé son vis-à-vis formé de la somme des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux. Ainsi, ce contenu est plus important de 15,58% au mois de décembre et de 13,49% au mois de mars en faveur des tannins condensés.
- Il est important de noter que le % différentiel du mois de décembre (15,58%) entre tannins condensés vs composés phénoliques + flavonoïdes totaux, diminue un peu au mois de mars (13,49%). Le rapport calculé est d'une valeur de 1,15. Dans cet ordre, le contenu en tannins condensés diminue plus au mois de mars ou bien ce sont les composés phénoliques et flavonoïdes totaux qui reprennent un tant soit peu le dessus pendant cette période ?
- Quoi qu'il en soit, Les rapports établis entre les deux périodes distinctes de récoltes des échantillons de feuilles (Décembre / Mars) par rapport au différentiel entre tannins condensés et la somme des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux donnent un rapport de 1 ($1,57/1,53 = 36,50/34,92$). Ceci indique que l'évolution des tannins condensés est identique à celle combinée des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux pour les deux périodes de récolte

Tableau 5 : Tannins condensés (TC) vs composés phénoliques totaux (TPC) + flavonoïdes totaux (FT)

	TC (mg EC / g MVS)	TPC + FT (mg / g MVS)	TC / TPC + FT % différentiel
<i>Décembre</i>	20,08	16,95	15,58 %
<i>Mars</i>	12,75	11,03	13,49 %
Rapports			1,15
<i>Décembre / Mars</i>	1,57	1,53	1,02
<i>% différentiel entre décembre et mars</i>	36,50 %	34,92 %	1,04

IV.1.4. Acide ascorbique

À la différence des contenus en composés phénoliques totaux, flavonoïdes totaux et tannins condensés, la détermination du contenu en acide ascorbique des échantillons de feuilles récoltés en deux périodes distinctes n'a pas montré de différence significative notable.

En effet, le dosage de l'acide ascorbique a donné lieu significativement au même contenu entre les feuilles de la récolte effectuée au mois de décembre ($0,15^a \pm 0,006$ mg EAA/g de MVS) et celle réalisée trois mois après ($0,16^a \pm 0,014$ mg EAA/g de MVS) (Fig. 27).

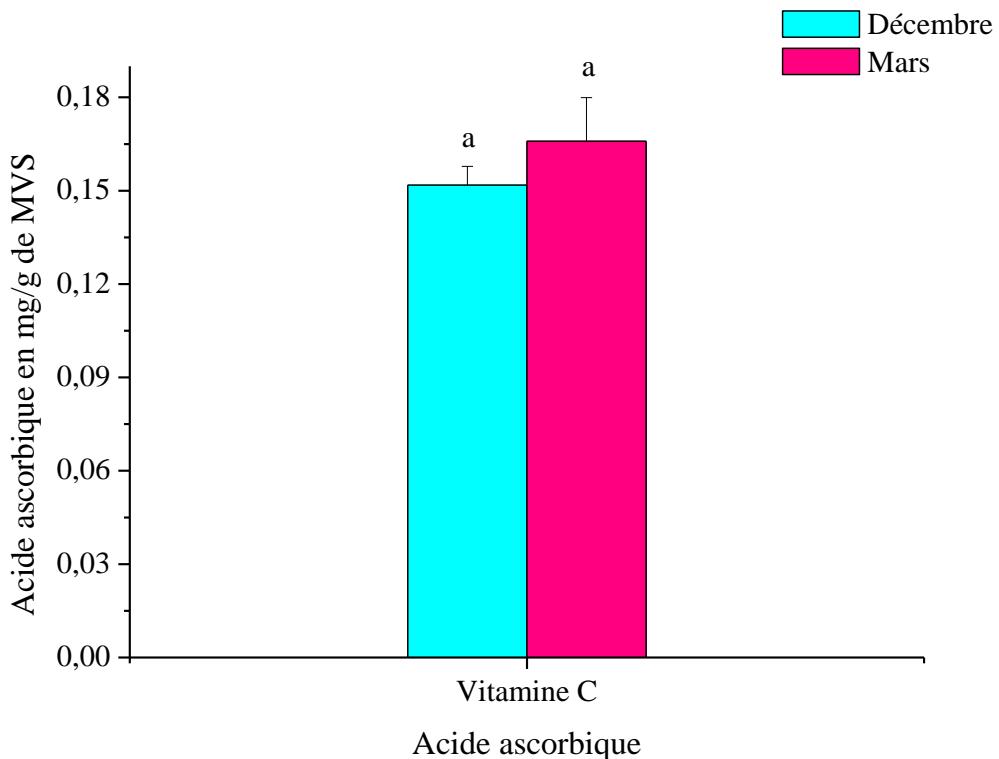


Figure 27 : Evolution du contenu moyen en acide ascorbique (équivalent en acide ascorbique) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare L.* récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). La même lettre n'indique aucune différence significative au seuil $\alpha = 0,05$.

IV.1.5. Malondialdéhyde

En plus de l'acide ascorbique, un métabolite impliqué dans la détoxication des formes réactives de l'oxygène, il a été procédé au dosage du niveau du MDA dans les feuilles du marrubie vulgaire provenant de deux récoltes distinctes. Pour rappel, le MDA est un produit de la peroxydation notamment des lipides.

Ce dosage a donné lieu à des contenus, mêmes s'ils sont infimes (puisque exprimés en $\mu\text{g/g}$ de MVS), complètement opposés à ce qui a été trouvé pour les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes totaux et les tannins condensés par rapport aux deux périodes de récolte.

En effet, on a trouvé que le contenu en MDA des feuilles récoltées au mois de mars ($13,85 \pm 0,75 \mu\text{g/g}$ de MVS) dépasse de 56,61% celui trouvé dans les feuilles récoltées au mois de décembre ($6,01 \pm 0,59 \mu\text{g/g}$ de MVS) (**Fig. 28**).

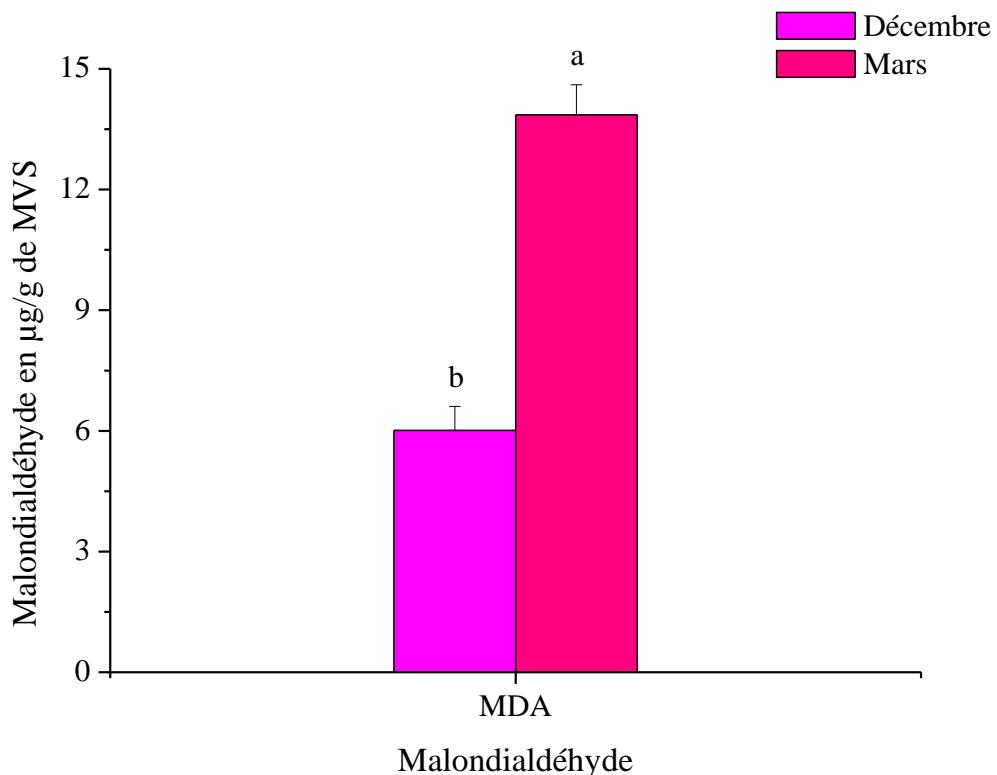


Figure 28 : Evolution du contenu moyen en malondialdéhyde (MDA) enregistré au niveau des extraits de poudre de feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées en deux périodes distinctes (Décembre et Mars). Les différentes lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha = 0,05$.

IV.2. Discussion

IV.2.1. Composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques totaux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. diminuent de 34,76% entre ce qui a été observé au mois de décembre par rapport au mois de mars correspondant à la fin de la phase hivernale et l'entrée dans la phase printanière.

Les composés phénoliques totaux étant une classe importante de métabolites secondaires présents chez de nombreuses plantes, y compris les plantes dites pérennes comme le cas de notre espèce. Ces composés jouent un rôle crucial dans la défense contre les agents pathogènes, la protection contre le stress oxydatif, ainsi que dans la croissance et le développement (Pratyusha et al. 2022).

Chez les plantes pérennes, le contenu en composés phénoliques totaux varie généralement au cours de leur cycle de développement. La tendance est qu'il peut être d'un niveau élevé lors de phases de croissance active ou de stress, comme la floraison ou la maturation des fruits, où la plante mobilise ses ressources pour se protéger et assurer sa reproduction. Par contre, durant les périodes de dormance ou de repos, ce contenu peut diminuer. Cette tendance permet aux plantes pérennes d'adapter leur production de composés phénoliques en fonction de leurs besoins physiologiques et environnementaux (**Guedri Mkaddem et al. 2022**).

La période hivernale est propice à une accumulation davantage de composés phénoliques pour assurer la protection. En revanche, au moment du débourrement, c'est-à-dire au moment où les bourgeons commencent à se développer, la concentration en composés phénoliques peut diminuer ou changer. C'est le signe où la plante mobilise ses ressources pour la croissance et la formation de nouvelles structures.

Par rapport au cycle de développement, **Fathiazad et al. (2017)** rapportent que l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Marrubium vulgare* L. récoltées en Iran au mois de juin renferment une quantité de 0,625 mg EAG/g de MVS en composés phénoliques totaux. Au mois de juin toujours, l'extrait méthanolique des feuilles de *M. vulgare* L. récoltées cette fois-ci au Maroc donnaient une quantité de 86,91 mg EAG/g de MVS dans une 1^{ère} région à bioclimat méditerranéen et une quantité de 24,77 mg EAG/g de MVS dans une 2^{ème} région à bioclimat semi-aride (**Hayat et al. 2020**).

Dans une autre étude, les extraits méthanoliques de feuilles du marrube vulgaire récoltées en hiver, au mois de janvier à Taza au Maroc, montrent une teneur en composés phénoliques totaux d'une valeur de 60,409 mg EAG/g de MVS (**Kabach et al. 2019**). Quant aux extraits méthanoliques des mois de mars, mai et juillet ; ils sont très peu fournis en polyphénols. C'est ce qui a été rapporté par une autre recherche, qui donne des quantités respectivement de 0,02 ; 0,04 et 0,01 mg EAG/g d'extrait. Ce dernier travail a été réalisé sur les parties aériennes collectées dans la région d'El Jadida au Maroc (**Khouchlaa et al. 2023**).

Il y a lieu de noter que le cycle de développement n'explique pas à lui seul les différences trouvées dans les contenus en composés phénoliques totaux. C'est aussi les différentes méthodes et conditions de travail utilisées pour l'extraction et le dosage de ces composés, les conditions de l'environnement ainsi que les caractéristiques génétiques propres à la plante qui déterminent les teneurs en composés phénoliques totaux des plantes (**El Idrissi et al. 2020 ; Hayat et al. 2020 ; Mssillou et al. 2021**).

A ce titre, rien que la provenance peut conduire à des différences significatives au sein de la même espèce. Dans ce sens plusieurs travaux ont montré cette diversité intra-spécifique parmi les populations provenant d'endroits différents (**Fratianni et al. 2007 ; Fawole et al. 2009 ; Boudjelal et al. 2012**).

C'est ce qui a été démontré chez *Marrubium vulgare* L. par **Guedri Mkaddem et al. (2022)**, qui relèvent que les teneurs les plus élevées en composés phénoliques totaux se retrouvent dans les extraits méthanoliques des provenances de Kasserine et Kef (respectivement 44,65 et 42,16 mg EAG/g de MVS). Par contre, les teneurs les plus faibles ont été trouvées dans l'extrait méthanolique provenant de la région de Nabeul, avec un contenu de seulement 20,80 mg EAG/g de MVS. Ces différences entre populations sont expliquées par les variations des conditions de l'environnement : climat, pression, humidité et édaphiques, qui traduisent une implication de ces composés dans l'adaptation des espèces aux conditions bioécologiques (**Matkowski and Piotrowska, 2006 ; Ksouri et al. 2008 ; Aćimović et al. 2020**).

Les niveaux en composés phénoliques trouvés dans le travail de **Guedri Mkaddem et al. (2022)** sont plus importants que ceux trouvés chez la même espèce provenant d'autres régions de Tunisie (**Rezgui et al. 2020**), ou même de Pologne (**Stanković, 2011**). De telles différences de niveau sont imputables aux bioclimats humides inférieurs, comme ceux de Beja et Bizerte, qui se caractérisent par une humidité relative élevée, mais avec des précipitations annuelles moins importantes que dans les bioclimats humides supérieurs. En d'autres termes, ces zones connaissent des précipitations supérieures à l'évaporation, mais pas autant que les régions plus humides.

Les conditions édaphiques sont l'un des facteurs majeurs qui influencent la composition en métabolites et en composés bioactifs au sein des plantes. Des travaux ont démontré que les différences substantielles dans les teneurs en composés phénoliques totaux sont imputables aux caractéristiques édaphiques, spécialement ceux liés à la salinité des sols (**Ksouri et al. 2008 ; Amri et al. 2017**).

IV.2.2. Flavonoïdes totaux

Bien que moins représentés que les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes totaux de nos dosages subissent eux aussi une diminution de 36,05% entre les récoltes du mois de décembre et du mois de mars. C'est presque autant que ce qui a été observé pour les composés phénoliques totaux (34,76%) et cette diminution est enregistrée dans le sens décembre → mars.

Les flavonoïdes sont un groupe de composés phénoliques. Ceux de *Marrubium vulgare* L. ont fait l'objet de plusieurs études pour leurs propriétés potentielles, notamment antibactériennes et antifongiques. Ces études ont révélé que les flavonoïdes de cette espèce, ainsi que d'autres composés phénoliques, peuvent avoir des effets significatifs sur les activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires et sur la santé en général (**Ghedadba et al. 2014 ; Bouterfas et al. 2016 ; Namoune et al. 2019 ; Aćimović et al. 2020 ; Hayat et al. 2020 ; Michalak et al. 2024**).

La teneur en flavonoïdes totaux de *Marrubium vulgare* L. varie tout au long de son cycle de développement. Les concentrations les plus élevées étant généralement observées au cours de la floraison. Ce sont surtout les flavonoïdes et les proanthocyanidines qui augmentent durant cette période (**Khouchlaa et al. 2023**).

Justement, le dosage des flavonoïdes réalisé à partir des extraits méthanoliques obtenus depuis les feuilles de *Marrubium vulgare* L. récoltées au mois de mars, mai et juillet montrent des teneurs respectivement de 1,644 ; 0,723 et 0,923 mg EQ/g d'extrait. Ces résultats indiquent que les extraits méthanoliques obtenus depuis les parties aériennes de la plante collectées avant la période de floraison (mars) montrent des teneurs en flavonoïdes plus élevées que ce qu'a été trouvé durant la période de floraison (mai) et après la période de floraison (juillet). De tels résultats associés aux résultats des polyphénols montrent la variabilité qui touche de tels composés, y compris les proanthocyanidines, par rapport aux étapes de développement notamment sa partie floraison : avant floraison, période de floraison et période post-floraison (**Khouchlaa et al. 2023**). Pour ces derniers auteurs, les teneurs en flavonoïdes et en proanthocyanidines sont plus élevées avant floraison que leurs équivalents au cours et après floraison. En revanche, le contenu des polyphénols est plus appréciable durant la floraison qu'avant et après la floraison.

Il y a lieu de noter que nos résultats concernant les flavonoïdes totaux ($1,60 \pm 0,07$ mg EQ/g de MVS) sont concordants avec ceux trouvés pour le mois de mars avant la période de floraison (1,644 mg EQ/g de MVS) par **Khouchlaa et al. (2023)**.

Un contenu de 1,620 mg EQ/g de MVS a été également signalé dans les extraits méthanoliques des parties aériennes du marrube vulgaire récoltées en Iran au mois de juin de l'année 2013 (**Fathiazad et al. 2017**). Durant ce mois de juin également mais de l'année 2019, les analyses effectuées sur les extraits méthanolique des parties aériennes du Marrube vulgaire récoltées en deux régions à bioclimats différents du Maroc, montraient des quantités en flavonoïdes de 33,82 mg EQ/g de MVS dans la région à bioclimat méditerranéen et de 10,59 mg EQ/g de MVS dans la région à bioclimat semi-aride (**Hayat et al. 2020**).

La prospection effectuée sur 8 provenances différentes du Marrube vulgaire effectuées au mois de mars durant la période de floraison, a donné des quantités en flavonoïdes assez variables entre les populations testées par rapport à leur localisation dans des régions à bioclimats très différents. Cependant, il est intéressant de noter que la quantité en flavonoïdes la plus faible a été signalée à Nabeul (8,91 mg ER/g de MVS), la plus forte a été trouvée à Kef (37,48 mg ER/g de MVS), le standard utilisé ici est de la rutine au lieu et place de la quercétine (**Guedri Mkaddem et al. 2022**).

Et pourtant Nabeul et Kef sont deux régions de Tunisie caractérisées toutes les deux par un climat inférieur semi-aride, c'est-à-dire des zones qui se situent à la limite entre les zones arides et les zones semi-arides. Mais ce qui caractérise Nabeul est que ses hivers sont doux

et les précipitations sont de 300-400 mm/année. En revanche Kef se caractérise par un hiver frais mais les précipitations varient entre 400-500 mm (**Guedri Mkaddem et al. 2022**).

De tels observations sont également en accord avec ce qui a été trouvé par **Amri et al. (2017)** et **Kabach et al. (2019)**. A titre d'exemple, les extraits méthanoliques issus de feuilles du marrubie vulgaire récoltées cette fois-ci pendant la période hivernale (janvier) au niveau de Taza au Maroc, montrent une teneur en flavonoïdes de 33,813 mg EQ/g de MVS (**Kabach et al. 2019**).

Il est intéressant de relever pour les flavonoïdes, comme d'ailleurs pour les composés phénoliques, que la variabilité du climat seule n'explique pas totalement l'hétérogénéité chimique observée entre populations. Plusieurs autres facteurs rentrent en jeu dont l'aspect génétique (**El Idrissi et al. 2020** ; **Hayat et al. 2020** ; **Mssillou et al. 2021**). Seulement, une corrélation positive lie entre les niveaux en polyphénols et en flavonoïdes. Les populations riches en composés phénoliques totaux présentent généralement des niveaux élevés en flavonoïdes ; alors que des niveaux plus faibles en polyphénols sont accompagnés de niveaux plus faibles en flavonoïdes (**Guedri Mkaddem et al. 2022**).

IV.2.3. Tannins condensés

Le contenu en tannins condensés dosé dans les échantillons de feuilles de *Marrubium vulgare* L. est assez appréciable, de l'ordre de $20,08 \pm 1,03$ mg EC/g de MVS en décembre et de $12,75 \pm 0,97$ mg EC/g de MVS en mars. Le pourcentage différentiel entre les 2 mois de récolte est de 36,49%. C'est autant que ce qui a été observé pour les composés phénoliques totaux (34,76%) et pour les flavonoïdes totaux (36,00%).

Marrubium vulgare L. renferme des tannins condensés. C'est un des types de composés phénoliques, connus pour leurs propriétés anti-oxydantes et médicinales potentielles (**Gourlay et al. 2022**). Différentes études ont montré que les extraits de *Marrubium vulgare* L. peuvent exhiber des quantités variables en ces composés. Cette variabilité peut être due à de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques, tels que les facteurs génétiques et environnementaux, ce qui peut influencer la qualité et la quantité de tels composés au sein du matériel végétal. D'autres facteurs liés à la récolte, au séchage et à la transformation peuvent également être à l'origine de ces variations (**Ouedraogo et al. 2021**).

Ainsi, selon le type du solvant utilisé pour l'extraction des tannins condensés, les meilleurs résultats sont obtenus avec l'éthyle-acétate (entre 230,93 et 252,68 mg EC/ g de l'extrait), les résultats intermédiaires sont obtenus avec le méthanol (entre 108,95 et 125,45 mg EC/ g de l'extrait) et les contenus les plus faibles sont obtenus dans un milieu aqueux (entre 2,73 et 6,94 mg EC/ g de l'extrait) (**Hayat et al. 2020**).

Par rapport aux conditions de l'environnement, 2 populations de *Marrubium vulgare* L. poussant dans deux localités différentes du nord-est Marocain, caractérisées l'une par un climat méditerranéen (26,5°C – 300-400 mm de précipitations / année – Humidité de 57%) et l'autre par un climat semi-aride (18°C – 250 mm de précipitations / année – Humidité de 73%), exhibent un contenu en tannins condensés plus élevé dans la 1^{ère} localité à bioclimat méditerranéen que dans la seconde localité à bioclimat semi-aride. Ces différences sont valables pour l'ensemble des solvants utilisés sauf l'extrait méthanolique, qui paradoxalement montre des contenus en tannins condensés inverses. En effet, avec cet extrait méthanolique, on a trouvé dans le marrube vulgaire de la localité à bioclimat semi-aride, un peu plus de tannins condensés (125,45 mg EC/ g de l'extrait) que son vis-à-vis poussant dans la localité à climat méditerranéen (108,95 mg EC/ g de l'extrait) (**Hayat et al. 2020**).

Par rapport à la saisonnalité des prélèvements et les périodes de croissance, les quantités en tannins condensés caractéristiques du marrube vulgaire sont de 23,966 mg EAG/g de MVS depuis les récoltes du mois d'avril au cours de la floraison de l'espèce au Maroc (**Gourich et al. 2023**). Autour de 4,46 mg E delphinidine /mL depuis les récoltes du mois de juin durant la phase de floraison en Pologne (**Michalak et al. 2024**) et aux alentours de 28,15 mg EC/g de MVS depuis les récoltes du mois d'avril des massifs montagneux du Tessala en Algérie à climat semi-aride (**Bouterfas et al. 2013**).

Les quantités en tannins condensés varient en fonction des saisons. C'est ce qui a été trouvé par exemple au niveau des feuilles d'*Athrixia phylicoides* L. Les concentrations les plus élevées ont été trouvées en automne (4,82%) par rapport aux périodes de l'hiver (2,44%), du printemps (2,66) et de l'été (3,04%) (**Mudau et al. 2007**).

Plus restrictif, les quantités en tannins condensés (proanthocyanidines) obtenues depuis les extraits méthanoliques des parties aériennes de *Marrubium vulgare* L. varient tout au long de la saison avant, pendant et après floraison. Ainsi, la quantité la plus élevée en tannins condensés est enregistrée avant la floraison au mois de mars (0,1954 mg EC/g de l'extrait), une baisse notable est observée durant la floraison au mois de mai (0,1293 mg EC/g de l'extrait) et après floraison au mois de juillet (0,1174 mg EC/g de l'extrait) (**Khouchlaa et al. 2023**).

IV.2.4. Acide ascorbique

L'acide ascorbique étant que très peu représenté au niveau des parties foliaires de *Marrubium vulgare* L. Nous n'avons en conséquence enregistré que des valeurs minimes, de l'ordre de 0,15 à 0,16 mg EAA/g de MVS. De plus, les dosages effectués n'ont pas donné lieu à des différences significatives notables entre ce qui a été dosé au mois de décembre et ce qui a été dosé au mois de mars.

Ce profil traduit un comportement typique de cette molécule, très sensible à l'oxydation. En effet, l'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble très réactif, qui peut être très rapidement oxydé en monodéhydroascorbate puis en déhydroascorbate (Truffault et al. 2014). Cette forme est souvent instable et difficilement détectable dans les extraits végétaux (Sheraz et al. 2015).

Cette tendance est fort répandue parmi plusieurs espèces végétales, en particulier dans les situations où le stress oxydatif augmente ou lorsque les défenses enzymatiques et non enzymatiques sont continuellement sollicitées. Le comportement de l'acide ascorbique ainsi observé peut-être caractéristique d'une mobilisation rapide suivie d'un épuisement progressif, en cohérence avec son rôle d'intervenant de premier ordre dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène, générées par le métabolisme cellulaire ou par des conditions de stress (Foyer & Noctor, 2009).

Contrairement aux flavonoïdes et aux tannins condensés qui peuvent s'accumuler temporairement, l'acide ascorbique n'a pas cette capacité. Il est immédiatement utilisé, ce qui pourrait expliquer sa baisse constante (Hasanuzzaman et al. 2019). Cette dynamique confirme que l'acide ascorbique agit comme un indicateur sensible de l'état oxydatif de la plante et que sa teneur est étroitement liée aux besoins immédiats en protection contre les stress internes ou environnementaux (Smirnoff & Wheeler, 2000).

Dans cette optique, des signaux abiotiques tels que la lumière UV, les variations de température, la nutrition minérale, la salinité d'un sol ou le stress hydrique induisent une synthèse de l'acide ascorbique. Cette synthèse est contrôlée par des hormones végétales et opère via la voie de Smirnoff-Wheeler. Des paramètres endogènes tels que la nature de l'organe, le stade de développement et le cycle circadien ne sont pas en reste et influencent également cette synthèse (Smirnoff & Wheeler, 2000).

Cette synthèse prépare la plante à une exposition aux espèces réactives de l'oxygène et active la mise en place d'un système de défense et de protection des structures photosynthétiques contre un tel stress. L'acide ascorbique est vite épuisé ou rapidement oxydé si le stress persiste ou si son ampleur augmente (Wang et al. 2024).

IV.2.5. Malondialdéhyde (MDA)

Le MDA, un produit de la peroxydation des lipides, a été dosé au niveau des échantillons de feuilles de *Marrubium vulgare* L. Ces dosages ont donné lieu à des contenus opposés par rapport à ce qui a été trouvé pour les composés phénoliques, flavonoïdes totaux et tannins condensés. En effet, le contenu en MDA des feuilles récoltées cette fois-ci au mois de mars ($13,85 \pm 0,75$ µg/g de MVS) dépasse de 56,61% celui trouvé dans les feuilles récoltées au mois de décembre ($6,01 \pm 0,59$ µg/g de MVS).

Le MDA est un marqueur sensible des dommages oxydatifs ciblant les membranes cellulaires. Sa teneur augmente en raison de la peroxydation induite par les formes réactives de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Ces formes réactives de l'oxygène apparaissent entre autres suite à un déséquilibre physiologique ou un stress environnemental (**Dizengremel, 2023**).

Les teneurs enregistrées au mois de mars sur les échantillons de *Marrubium vulgare* L., plus importantes que ce qui a été enregistré au mois de décembre, peut traduire un stress oxydatif subit par ces plantes. Il coïncide justement avec la fin de la période hivernale et l'entrée en période printanière, phase à laquelle notre espèce va pouvoir passer de la phase végétative à une phase de croissance active, en mettant en place de nouveaux axes feuillés.

Ce phénomène de stress oxydatif peut également décrire une perte d'efficacité des systèmes antioxydants naturels de la plante selon la perte des composés protecteurs tels que l'acide ascorbique, les polyphénols et les flavonoïdes (**Gourich et al. 2023**).

C'est ce qui est rendu avec les teneurs en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins condensés dont les teneurs diminuent au mois de mars par rapport à leurs vis-à-vis respectifs dosés au mois de décembre. Paradoxalement, la teneur de l'acide ascorbique reste stable entre les deux types de récolte. Même si elle est que peu représentée, en terme de quantité, elle pourrait dans ce cas jouer un rôle déterminant dans la détoxication des formes réactives de l'oxygène et soutenir la sortie de la phase végétative vers la nouvelle phase de croissance active (**Truffault et al. 2014**).

Il ne faut pas exclure aussi que des teneurs assez élevées en MDA peuvent être également présentes dans les feuilles sénescentes ou naturellement sénescentes et où l'activité anti-oxydante est réduite (**Dhindsa et al. 1981**). C'est ce qui pourrait conforter les résultats trouvés chez nos plantes qui sont en instance de passage de la phase végétative vers la phase de renouvellement des axes feuillés, coïncidant avec l'entrée du printemps.

Le comportement du MDA entre les 2 phases de récolte distinctes marque un niveau d'état de stress de la plante, tant en exprimant sa sensibilité aux contraintes abiotiques qu'en démontrant sa capacité à les contrer par l'apport de modifications notamment métaboliques. Cela nous permet de marquer avec précision, les moments critiques du cycle de développement de notre plante dans son milieu naturel où elle prospère.

CONCLUSION

V. Conclusion

L'objectif principal de cette étude est de suivre dans les feuilles de *Marrubium vulgare* L., l'évolution temporelle de certains métabolites bioactifs secondaires (composés phénoliques, flavonoïdes, tannins condensés et acide ascorbique) ; et du malondialdéhyde, marqueur clé de la peroxydation lipidique et du stress oxydatif.

Ce suivi a concerné les échantillons foliaires du marrubie vulgaire récoltés dans une seule station située à Draâ-El-Kaïd (Kherrata - au sud-est de Bejaia), mais en deux saison distinctes de l'année : début de l'hiver et fin de l'hiver. Le climat qui prévaut est de type méditerranéen (Csa selon la classification de Köppen), qui se caractérise par des étés chauds et secs et des hivers doux et humides.

Par rapport au cycle de développement du marrubie vulgaire, ces deux saisons correspondent à l'entrée en phase de repos hivernale suivi d'une reprise de la croissance et du développement au tout début de la saison printanière.

L'analyse des résultats obtenus a mis en évidence des quantités en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux supérieurs dans les récoltes de décembre que dans les récoltes du mois de mars. Cette régulation temporelle fine de ces composés secondaires, ne font que traduire une réponse transitoire fortement dépendante de facteurs physiologiques, environnementaux et développementaux.

Les tannins condensés suivent une trajectoire semblable à celle des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux. Ils sont par ailleurs plus abondants que ces deux derniers, au mois de décembre comme au mois de mars. A la différence des composés phénoliques et des flavonoïdes qui sont de potentiels antioxydants, les tannins condensés ont une fonction plus structurale et protectrice à long terme des tissus.

L'accumulation précoce de ces métabolites au mois de décembre reflète une réaction d'adaptation de la plante pour renforcer sa protection contre les espèces réactives de l'oxygène. C'est aussi une période où la plante mobilise activement ces ressources pour maintenir l'équilibre redox cellulaire. A la fin de l'hiver, la diminution de ces métabolites ne peut être traduite que par leur consommation dans des réactions de défense, à leur dégradation enzymatique ou bien à leur conversion en formes oxydées ou conjuguées. C'est aussi la période de la sénescence des anciennes feuilles, sources de formes réactives de l'oxygène, que de tels métabolites bioactifs doivent piéger impérativement au risque de nuire à la reprise active de la croissance et la formation de nouvelles pousses.

Ce dynamisme temporel implique que les composés phénoliques et les flavonoïdes ne sont pas conservés de manière durable dans les tissus, mais sont synthétisés, mobilisés, puis métabolisés selon la demande de la plante. Leur production étant maximale aux stades de développement intermédiaires ou sous réponse aux stimulations environnementales.

Sur ce plan, ce n'est pas le cas des tannins condensés dont la biosynthèse est en général moins sensible aux stimuli immédiats et se développe dans le cadre d'une stratégie de défense prolongée. Ils sont synthétisés de manière plus régulière, sont accumulés progressivement et se déploient progressivement. Ce type est typique des métabolites secondaires engagés dans le renforcement cellulaire ou des réponses contre les agressions externes.

L'acide ascorbique dosé est très peu représenté et ne diffère pas entre les 2 périodes de récolte des échantillons de feuilles où il a été mis en évidence. Le peu d'acide ascorbique trouvé pourrait indiquer que cette molécule est de manière active, mobilisée dans les réactions anti-oxydases pour faire face aux radicaux libres. En parallèle, le malondialdéhyde a été trouvé dans les deux types d'échantillons de feuilles analysées, beaucoup plus à la fin de la saison hivernale qu'à son début. Cela est tout à fait naturel d'autant que ça coïncide avec la fin d'une saison stressante pour rentrer dans une nouvelle phase de croissance.

Au final, autant pour *Marrubium vulgare* L. que pour les autres espèces vivaces, le métabolisme secondaire est rythmé par les facteurs temporels du cycle de vie de la plante ; et qu'il est fortement corrélé aux rythmes biologiques internes et au stress oxydatif. Ces facteurs doivent être considérés dans toute stratégie de valorisation du matériel végétal. Les résultats acquis donnent lieu à d'autres objectifs qu'il faut considérer ; Il serait dès lors assez pertinent de porter cette étude aux autres constituants de la plante : tiges, racines et fleurs ; de faire une caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques ; et de doser l'activité biologique réelle des extraits.

Il reste à conforter ces observations par d'autres études qui complètent d'une part la saisonnalité de ce cycle de vie et l'analyse d'autres métabolites notamment ceux appartenant au métabolisme primaire.

*RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*

VI. Références bibliographiques

Aćimović M., Jeremić K., Salaj N., Gavarić N., Kiprovska B., Sikora V., Zeremski T. **2020**. *Marrubium vulgare* L. : A phytochemical and pharmacological overview. *Molecules* 24;25(12) : 2898.

DOI: [10.3390/molecules25122898](https://doi.org/10.3390/molecules25122898)

Ahvazi M., Balali G.R., Jamzad Z., Saeidi H. **2018**. A taxonomic, morphological and pharmacological review of *Marrubium vulgare* L., an old medicinal plant in Iran. *Journal of Medicinal Plants* 17(65):7-24.

<http://jmp.ir/article-1-2082-en.html>

Ali M.E. **2018**. Adaptation of *Marrubium vulgare* L. species to the habitat alteration in disturbance regime. *Egyptian Journal of Botany* 58(2) : 287-296.

DOI: [10.21608/ejbo.2017.1467.1116](https://doi.org/10.21608/ejbo.2017.1467.1116)

Amri B., Martino E., Vitulo F., Corana F., Kaâb L.B., Rui M., Rossi D., Mori M., Rossi S., Collina S. **2017**. *Marrubium vulgare* L. leave extract: phytochemical composition, antioxidant and wound healing properties. *Molecules* 22:1851-1869.

DOI: [10.3390/molecules22111851](https://doi.org/10.3390/molecules22111851)

Bennett J.A., Socash T., Khamis N., Justik M.W. **2024**. Electrochemical investigation of the oxidation of phenolic compounds using hypervalent iodine oxidants. *ACS Omega* 9 : 47361-47367.

DOI: [10.1021/acsomega.4c09236](https://doi.org/10.1021/acsomega.4c09236)

Boizot N., Charpentier J.-P. **2006**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006* : 79-82.

<https://www.researchgate.net/publication/341819016>

Boudjelal A., Henchiri C., Siracusa L., Sari M., Ruberto G. **2012**. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia* 83(2) : 286-292.

DOI: [10.1016/j.fitote.2011.11.005](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.11.005)

Bouterfa K., Mehdadi Z., Latreche A., Cherifi K. **2013**. Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale). *Ecologia Mediterranea* 39(2) : 39-57.

Bouterfa K., Mehdadi Z., Elaoufi M.M., Latreche A., Benchiha W. **2016**. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Ann. Pharm. Fr.* 74(6) : 453-462.

DOI: [10.1016/j.pharma.2016.07.002](https://doi.org/10.1016/j.pharma.2016.07.002)

Carović-Stanko K., Petek M., Grdiša M., Pintar J., Bedeković D., Ćustić M. Satovic Z. **2016**. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods – a review. *Czech Journal of Food Sciences* 34(5):377-390.

DOI: [10.17221/504/2015-CJFS](https://doi.org/10.17221/504/2015-CJFS)

Christ B., Mueller K.H. **1960**. On the serial determination of the content of flavonol derivatives in drugs. *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* 293(65) : 1033-1042.
[DOI: 10.1002/ardp.19602931202](https://doi.org/10.1002/ardp.19602931202)

Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. **2006**. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In : Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet, edited by A. Crozier, Clifford M.N. & Ashihara H. © 2006 by Blackwell Publishing Ltd.
[ISBN: 10:1-4051-2509-8](https://doi.org/10.1002/ardp.19602931202)

Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P., Thorpe T.A. **1981**. Leaf senescence: correlated with levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32(126) : 93-101.
<https://www.jstor.org/stable/23689973>

Dizengremel P. **2023**. Contraintes environnementales et stress oxydant chez les plantes. *Encyclopédie de l'environnement*. <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/>
[ISSN: 2555-0950](https://doi.org/10.2436/12.000.0950)

El Idrissi A.E., Khouchlaa A., Bouyahya A., Bakri Y. Tijane M. **2020**. Phytochemical characterization, *in vitro* antioxidant, cytotoxic, and antibacterial effects of *Aristolochia longa* L. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11(1) : 8129-8140.
[DOI: 10.33263/BRIAC111.81298140](https://doi.org/10.33263/BRIAC111.81298140)

Élie F. **2022**. Les phénols et les polyphénols. © site 38pp.
<http://fred.elie.free.fr>

Fathiazad F., Rameshrad M., Asghari S., Hamedeyazdan S., Garjani A., Maleki-Dizaji N. **2017**. Phytochemical screening and anti-inflammatory effect of *Marrubium vulgare* L. methanol extract on carrageenan-induced paw inflammation in rats. *Pharmaceutical Sciences* 23(1) : 3-11.
[DOI: 10.15171/PS.2017.02](https://doi.org/10.15171/PS.2017.02)

Fawole O.A., Ndhlala A.R., Amoo S.O., Finnie J.F., Van Staden J. **2009**. Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 123(2) : 237-243.
[DOI: 10.1016/j.jep.2009.03.012](https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.012)

Floareş D., Pluștea L., Dinulescu C., Alexa E., Radulov I. **2023**. Secondary metabolites in plants: structure, biosynthesis, bioactive properties. *Research Journal of Agricultural Science* 55(2) : 57-71.
[ISSN: 2668-926X](https://doi.org/10.1089/ars.2008.2177)

Foyer C.H., Noctor G. **2009**. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 11 : 861-905.
[DOI: 10.1089/ars.2008.2177](https://doi.org/10.1089/ars.2008.2177)

Fratianni F., Tucci M., De Palma M., Pepe R., Nazzaro F. **2007**. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry* 104 : 1282-1286.
[DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.01.044](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.044)

Ghassemi-Golezani K., Abdoli S. **2022**. Physiological and biochemical responses of medicinal plants to salt stress. In Aftab T. (eds) Environmental Challenges and Medicinal Plants. *Springer, Cham.*

DOI: [10.1007/978-3-030-92050-0_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-92050-0_6)

Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L., Benbia S., Mouloud Y. **2014**. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuris de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12 : 15-24.

DOI: [10.1007/s10298-014-0832-z](https://doi.org/10.1007/s10298-014-0832-z)

Gourich A.A., Touijer H., Drioiche A., Asbabou A., Remok F., Saidi S., Siddique F., Ailli A., Bourhia M., Salamatullah A.M., Ouahmane L., Mouradi A., Eto B., Zair T. **2023**. Insight into biological activities of chemically characterized extract from *Marrubium vulgare* L. *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approaches. *Frontiers in Chemistry* 11 : 1238346.

DOI: [10.3389/fchem.2023.1238346](https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1238346)

Gourlay G., Hawkins B.J., Albert A., Schnitzler J.-P. **2022**. Condensed tannins as antioxidants that protect poplar against oxidative stress from drought and UV-B. *Plant Cell Environ.* 45(2) : 362-377.

DOI: [10.1111/pce.14242](https://doi.org/10.1111/pce.14242)

Guedri Mkaddem M., Zrig A., Ben Abdallah M., Romdhane M., Okla M.K., Al-Hashimi A., Alwase Y.A., Hegab M.Y., Madany M.M., Hassan A.H., Beemster G.T., AbdElgawad H. **2022**. Variation of the chemical composition of essential oils and total phenols content in natural populations of *Marrubium vulgare* L. *Plants (Basel)* 11(5) : 612.

DOI: [10.3390/plants11050612](https://doi.org/10.3390/plants11050612)

Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H., Anee T.I., Parvin K., Nahar K., Al Mahmud J., Fujita M. **2019**. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants (Basel)* 8(9) : 384.

DOI: [10.3390/antiox8090384](https://doi.org/10.3390/antiox8090384)

Hayat J., Akodad M., Moumen A., Baghour M., Skalli A., Ezrari S., Belmalha S. **2020**. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. *Heliyon* 6(11) : e05609.

DOI: [10.1016/j.heliyon.2020.e05609](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05609)

Julkunen-Titto R. **1985**. Phenolics constituents in the leaves of northern willos: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 33 : 213-217.

DOI: [10.1021/jf00062a013](https://doi.org/10.1021/jf00062a013)

Julve P. **2021**. Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. www.tela-botanica.org/projets/phytosociologie

Kabach I., Ben Mrid R., Bouchmaa N., Bouargalne Y., Zyad A., Nhiri M. **2019**. Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic activities of *M. vulgare*. *International Journal of Pharmaceutical Research* 11(3) : 338-345.

<https://www.researchgate.net/publication/342881329>

Khouchlaa A., Rahimi A., Mimouni M., Rais C., Khamar H., Zaakour F. **2023**. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activities of *Marrubium vulgare* L. collected in three development stages. *Notulae Scientia Biologicae* 15(3) : 11615. [DOI: 10.15835/nsb15311615](https://doi.org/10.15835/nsb15311615)

Klein B.P., Perry A.K. **1982**. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science* 47 : 941-945. [DOI: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb12750.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12750.x)

Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C. **2008**. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies* 331(11) : 865-873. [DOI: 10.1016/j.crvi.2008.07.024](https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.024)

Kuljarusnont S., Iwakami S., Iwashina T., Tungmunnithum D. **2024**. Flavonoids and other phenolic compounds for physiological roles, plant species delimitation, and medical benefits: a promising view. *Molecules* 29 : 5351. [DOI: 10.3390/molecules29225351](https://doi.org/10.3390/molecules29225351)

Kumar K., Debnath P., Singh S., Kumar N. **2023**. An overview of plant phenolics and their involvement in abiotic stress tolerance. *Stresses* 3 : 570-585. [DOI: 10.3390/stresses3030040](https://doi.org/10.3390/stresses3030040)

Lippai A., Smith P.A., Price T.V., Weiss J., Lloyd C.J. **1996**. Effects of temperature and water potential on germination of horehound (*Marrubium vulgare*) seeds from two Australian localities. *Weed Science* 44(1) : 91-99. [DOI: 10.1017/S0043174500093607](https://doi.org/10.1017/S0043174500093607)

Lodhi S., Vadnere G., Sharma V., Usman M.R. **2017**. *Marrubium vulgare* L.: A review on phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 6(4) : 429-452. [DOI: 10.5455/jice.20170713060840](https://doi.org/10.5455/jice.20170713060840)

Masoodi M., Ali Z., Liang S., Yin H., Wang W., Khan I.A. **2015**. Labdane diterpenoids from *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry Letters* 13 : 275-279. [DOI: 10.1016/j.phytol.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.07.005)

Matkowski A., Piotrowska M. **2006**. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from Lamiaceae. *Fitoterapia* 77(5) : 346-353. [DOI: 10.1016/j.fitote.2006.04.004](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.04.004)

Michałak M., Stryjecka M., Zagórska-Dziok M., Żarnowiec P. **2024**. Biological activity of horehound (*Marrubium vulgare* L.) herb grown in Poland and its phytochemical composition. *Pharmaceutics* 17 : 780. [DOI: 10.3390/ph17060780](https://doi.org/10.3390/ph17060780)

Michel J., Abd Rani N., Husain K. **2020**. A review on the potential use of medicinal plants from Asteraceae and Lamiaceae plant family in cardiovascular diseases. *Front Pharmacol* 11:852. [DOI: 10.3389/fphar.2020.00852](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00852)

Mssillou I., Agour A., Hamamouch N., Lyoussi B., Derwich E. **2021**. Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Marrubium vulgare* L. *Scientific World Journal* 2021 : 7011493.

DOI: [10.1155/2021/7011493](https://doi.org/10.1155/2021/7011493)

Mudau F.N., Ngele A., Mashela P.W., Soundy P. **2007**. Seasonal variation of tannin content in wild bush tea. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 1(1) : 74-76. ©2007 Global Science Books

Nair V., O'Neil C.L., Wang P.G. **2008**. Malondialdehyde. *Encyclopedia of Reagents for Organic synthesis*.

DOI: [10.1002/047084289X.rm013.pub2](https://doi.org/10.1002/047084289X.rm013.pub2)

Namoune I., Khettal B., Assaf A.M., Elhayek S., Arrar L. **2019**. Activités antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits organiques et aqueux du *Marrubium vulgare* Nord-Est algérien. *Phytothérapie* 17(2).

DOI: [10.3166/phyto-2018-0106](https://doi.org/10.3166/phyto-2018-0106)

Nedjimi B., Souissi Z.E., Guit B., Daoud Y. **2020**. Differential effects of soluble salts on seed germination of *Marrubium vulgare* L. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 17 - 100250.

DOI: [10.1016/j.jarmap.2020.100250](https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100250)

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. **1979**. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2) : 351-358.

DOI: [10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Ouedraogo S., Yoda J., Traore T.K., Nitiema M., Sombie B.C., Diawara H.Z., Yameogo J.B., Djande A., Belemnaba L., Kini F.B., Ouedraogo S., Semde R. **2021**. Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 15(2) : 750-772.

DOI: [10.4314/ijbcs.v15i2.28](https://doi.org/10.4314/ijbcs.v15i2.28)

Paray F., Shafi S., Hussein I.M., Khan I.A., Ali Z. **2022**. *Marrubium vulgare* L.: traditional uses, phytochemistry, and pharmacological profile. In: Masoodi M.H., Rehman M.U. (eds) *Edible Plants in Health and Diseases*. Springer, Singapore.

DOI: [10.1007/978-981-16-4959-2_11](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4959-2_11)

Pratyusha S. **2022**. Phenolic compounds in the plant development and defense: An overview. In : Plant stress physiology – Perspectives in agriculture edited by M. Hasanuzzaman & Nahar K.

DOI: [10.5772/intechopen.102873](https://doi.org/10.5772/intechopen.102873)

Quezel P., Santa S. **1963**. Nouvelle flore de l'Algérie et de ses régions désertiques méridionales. Tome II. Paris, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. In : *La Terre et la Vie, Revue d'histoire Naturelle, tome 18, N°2, 1964, p.238*.

www.persee.fr/doc/revec_0040-3865_1964_num_18_2_4410_t1_0238_0000_2

Rezgui M., Majdoub N., Mabrouk B., Baldisserotto A., Bino A., Ben Kaab L.B., Manfredini S. **2020**. Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from

Marrubium vulgare L. against pathogenic dermatophyte strains. *J. Mycol. Med.* 30(1), 100927.

DOI: 10.1016/j.mycmed.2020.100927

Ribéreau-Gayon P. **1968**. Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod, Paris*, 254pp.

ASIN: B000IUPFD4

Sagorin G., Cazeils E., Basset J.-F., Reiter M. **2021**. From pine to perfume. *Chimia* 75(9), 780.

DOI: 10.2533/chimia.2021.780

Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N. **2001**. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91(1-2), 21-40.

DOI: 10.1016/S0377-8401(01)00228-0

Sheraz M.A., Khan M.F., Ahmed S., Kazi S.H., Ahmad I. **2015**. Stability and stabilization of ascorbic acid. A review. *Household and Personal Care Today* 10(3), 22-25.

<https://www.researchgate.net/publication/321148774>

Shraim A., Talaat A. Rahman M.M., Hiji Y. **2021**. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT* 150(2) : 111932.

DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111932

Singleton V.L., Rossi J.A. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16 : 144-158.

DOI: 10.5344/ajev.1965.16.3.144

Smirnoff N., Wheeler G.L. **2000**. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35(4) : 291-314.

DOI: 10.1080/10409230008984166

Spichiger R.E., Savolainen V.V., Figeat-Hug M., Jeanmonod D., Perret M. **2004**. Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. *Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes*. 413 pp.

ISBN: 2-88074-502-0

Stanković M.S. **2011**. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac. J. Sci.* 33 : 63–72.

<https://www.researchgate.net/publication/230766461>

Suc J.-P., Popescu S.-M., Fauquette S., Bessedik M., Jiménez-Moreno G., Bachiri-Taoufiq N., Zheng Z., Médail F., Klotz S. **2018**. Reconstruction of Mediterranean flora, vegetation and climate for the last 23 million years based on an extensive pollen dataset. *Ecologia Mediterranea* 44(2) : 53-85.

Surana A.R., Kumbhare M.R., Wagh R.D. **2016**. Estimation of total phenolic and total flavonoid content and assessment of *in vitro* antioxidant activity of extracts of *Hamelia patens* Jacq. stems. *Research Journal of Phytochemistry* 10(2) : 67–74.

DOI: 10.3923/ijphyto.2016.67.74

Sytar O., Hajihashemi S. **2024**. Specific secondary metabolites of medicinal plants and their role in stress adaptation. In : Plant secondary metabolites and abiotic stress edited by G.C. Nikalje, Shahnawaz M., Parihar J., Qazi H.A., Patil V.N. & Zhu D.
[DOI: 10.1002/9781394186457.ch15](https://doi.org/10.1002/9781394186457.ch15)

Tommasi I.C. **2019**. Carboxylation of hydroxyaromatic compounds with HCO_3^- by enzyme catalysis: recent advances open the perspective for valorization of lignin-derived aromatics. *Catalysts* 9 : 37.
[DOI: 10.3390/catal9010037](https://doi.org/10.3390/catal9010037)

Truffault V., Gest N., Garchery C., Causse M., Duboscq R., Riqueau G., Sauvage C., Gautier H., Baldet P., Stevens R. **2014**. Variation in tomato fruit ascorbate levels and consequences of manipulation of ascorbate metabolism on drought stress tolerance. In Proc. IInd IS on Biotechnology of Fruit Species, Ed. S.E. Gardiner. *Conference Paper in Acta Horticulturae*: 75-84.

[DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1048.8](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1048.8)

Villanueva J.R., Esteban J.M., Villanueva L.R. **2017**. A reassessment of the *Marrubium vulgare* L. herb's potential role in diabetes mellitus type 2: first results guide the investigation toward new horizons. *Medicines* 4(3) : 57.

[DOI: 10.3390/medecines4030057](https://doi.org/10.3390/medecines4030057)

Wang C., García-Caparros P., Li Z., Chen F. **2024**. A comprehensive review on plant ascorbic acid. *Tropical Plants* 3 : e042.

[DOI: 10.48130/tp-0024-0042](https://doi.org/10.48130/tp-0024-0042)

Weitner T., Inić S., Jablan J., Gabričević M., Domijan A.-M. **2016**. Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croat. Chem. Acta* 89(1) : 133-139.

[DOI: 10.5562/cca2902](https://doi.org/10.5562/cca2902)

Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N. **1998**. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393(6683) : 365-369.

[DOI: 10.1038/30728](https://doi.org/10.1038/30728)

Yabrir B. **2019**. Essential oil of *Marrubium vulgare*: Chemical composition and biological activities. A review. *Natural Product Sciences* 25(2) : 81-91.

[DOI: 10.20307/nps.2019.25.2.81](https://doi.org/10.20307/nps.2019.25.2.81)

Résumé

Une Lamiaceae, *Marrubium vulgare* L., plante médicinale réputée riche en métabolites secondaires, fait l'objet d'un intérêt grandissant en raison de ses multiples bénéfices sur la santé. Le but de ce travail est d'étudier l'évolution temporelle de certains de ces composés bioactifs depuis les feuilles récoltées d'une région à climat méditerranéen (Csa selon la classification de Köppen), englobant 2 phases distinctes de récolte en lien avec le cycle de développement typique d'une plante vivace, comme le marrube vulgaire. Ces récoltes ont lieu l'une au mois de décembre, l'autre au mois de mars et les métabolites dosés sont au nombre de quatre (les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tannins condensés et l'acide ascorbique), en plus d'un marqueur du stress oxydatif résultant de la peroxydation lipidique (le malondialdéhyde). Les résultats obtenus montrent des fluctuations significatives de la teneur de ces composés au cours des deux phases contrastées du cycle de vie de cette plante. Ils mettent en évidence des périodes de physiologie favorables à l'accumulation optimale des substances anti-oxydantes à l'entrée de l'hiver, suivi d'une diminution concomitante à sa sortie. Le malondialdéhyde se comporte à l'inverse des substances anti-oxydantes. Ces résultats soulignent le comportement de l'espèce dans son milieu naturel face aux contraintes climatiques méditerranéennes.

Mots clés : *Marrubium vulgare* L., composés phénoliques, flavonoïdes, tannins condensés, acide ascorbique, malondialdéhyde, climat méditerranéen.

Abstract

Lamiaceae (*Marrubium vulgare* L.), a medicinal plant renowned for its rich secondary metabolites, is the subject of growing interest due to its multiple health benefits. The aim of this study was to investigate the temporal evolution of some of these bioactive compounds in leaves harvested in a region with a Mediterranean climate (Csa according to Köppen's classification), comprising two distinct harvest phases associated with the typical growth cycle of a perennial plant such as *Marrubium vulgare*. One harvest took place in December and the other in March, and four metabolites (phenolic compounds, flavonoids, condensed tannins and ascorbic acid) were measured, as well as a marker of oxidative stress induced by lipid peroxidation (malondialdehyde). The results show significant fluctuations in the levels of these compounds during the two contrasting phases of the plant's life cycle. These results highlight the physiological periods favorable for optimal antioxidant accumulation at the start of winter, followed by a concomitant decrease at the end of winter. Malondialdehyde behaves in the opposite way to antioxidants. These results confirm the behavior of this species in its natural environment in the face of Mediterranean climatic constraints.

Keywords: *Marrubium vulgare* L., phenolic compounds, flavonoids, condensed tannins, ascorbic acid, malondialdehyde, Mediterranean climate.