
Composés phénoliques et capacité antioxydante des extraits méthanoliques du Tripodion (*Anthyllis tetraphylla* L.)

Manel Ouerfelli^{1*}, Maria Pilar Almajano², Leila Bettaieb Ben Kaâb¹

¹Laboratoire de recherche « Nutrition et Métabolisme Azotés et Protéines de stress » unité 99 UR/09-20, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie.

²Laboratoire de Génie Chimique, École de Génie Industriel de Barcelona, Université Polytechnique de Catalogne, Av. Diagonal 649, 08034 Barcelone, Espagne.

*Auteur correspondant : Adresses e-mail : bio.m.0105.ouerf@gmail.com (M.Ouerfelli), m.pilar.almajano@upc.edu (MP. Almajano), leila.bk@planet.tn (L. Bettaieb- Ben Kaâb)

Résumé

Le stress oxydant, causant plusieurs maladies, suscite la recherche de nouveaux remèdes antioxydants. Dans cette optique, l'étude de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques du Tripodion (*Anthyllis tetraphylla* L.) a été étudiée. Cette plante est issue de la région semi-aride de la Tunisie, précisément du Parc National de Boukornine, et appartient à la famille des Fabacées. Les extraits foliaires et floraux sont obtenus après macération dans le méthanol pendant 24h. Le tri phytochimique, l'activité antioxydante par les tests ORAC et TEAC et l'inhibition de la peroxydation lipidique dans le modèle d'émulsion huile/eau ont été réalisés. Le tri phytochimique a permis de révéler que ces extraits contiennent des teneurs importantes en polyphénols et flavonoïdes surtout au niveau de l'extrait floral (75.93 mg EAG/g MS et 87.86 EQ mM/L d'extrait, respectivement) qui présente aussi les activités antioxydantes (ORAC et TEAC) les plus élevées (92.36 mM TE /g MS et 0.13 µM TE/ g MS, respectivement). En ce qui concerne la capacité antioxydante de la poudre lyophilisée des feuilles et des fleurs testée dans l'émulsion, formée par l'huile de tournesol dans l'eau, les fleurs ont présenté la valeur la plus faible de l'indice de peroxyde, c'est à dire la meilleure activité antioxydante, tandis que les feuilles n'ont présenté un effet antioxydant puissant qu'au début du processus d'oxydation.

Mots-clés: composés phénoliques, Antioxydants, émulsion, oxydation lipidique, Tripodion.

Summary

Oxidative stress, causing several diseases, raises the search for new antioxidants cures. In this context, the study of the antioxidant activities of methanol extracts of Tripodion (*Anthyllis tetraphylla* L.) was undertaken. This plant was collected from the semi-arid region of Tunisia, precisely from the National Park of Boukornine and belongs to the Fabaceae family. The leaf and flower extracts are obtained after maceration in methanol for 24h. Phytochemical analyses, antioxidant activity, determined by ORAC and TEAC tests, and inhibition of lipid peroxidation in the model oil / water emulsion, have been made. The phytochemical analysis has revealed that leaf and flower extracts contain high levels of polyphenols and flavonoids especially in the flower extract (75.93- mg EAG / g DM and 87.86 EQ mM / L extract, respectively) which present also the highest antioxidant activities determined by ORAC and TEAC tests (92.36 mM TE / g DM and 0.13 µM TE / g DM, respectively). However, among the antioxidant capacity of the freeze-dried powder of leaves and flowers tested in the emulsion formed by sunflower oil in water, flowers had the lowest peroxide values, this fact means that they present the highest antioxidant activity, while the leaves have a powerful antioxidant effect only at the beginning of the oxidation process.

Key words: phenolic compounds, Antioxidants, emulsion, lipid oxidation, Tripodion.

1. Introduction

Les plantes médicinales représentent une véritable fortune pour l'humanité utilisée dans différents domaines tels que la pharmacie, la cosmétologie et l'industrie alimentaire (Lubbe et Verpoorte, 2011). Comme elles contiennent un large spectre de molécules bioactives importantes, par exemple les composés phénoliques, des parties spécifiques de ces plantes (feuilles, fleurs, racines, etc.) sont utilisées pour des fins thérapeutiques (De la Calle et al., 2013). Les actions constructives et bénéfiques attribuées à ces composés sont en raison de leur fort potentiel antioxydant (Heim et al., 2002). Pour

cette raison, beaucoup de gens dans les pays à travers le monde font confiance aux produits à base de plantes médicinales pour maintenir leur santé et traiter beaucoup de maladies (Smith-Hall et al., 2012). Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'obtention d'antioxydants naturels à partir de plantes (Kim et al., 2010). L'utilisation croissante des extraits de plantes suggère une étude systématique des différentes parties de la plante pour trouver des composés actifs (Nostro et al., 2000). Ces composés sont connus comme une épée à double tranchant, car ils sont essentiels pour les deux ; les plantes elles-mêmes et la santé humaine. Dans une part, ils ont une importance morphologique et physiologique du fait qu'ils jouent un rôle principal dans la croissance et la reproduction de la plante (Bravo, 1998). D'autre part, ils offrent un large éventail d'antioxydants naturels qui offrent des avantages pour la santé humaine (Kim et al., 2010) par la réduction de la concentration des radicaux libres dans le corps, la chélation des ions métalliques, et la prévention contre la peroxydation lipidique (Pienitz et al., 2009). En plus de leur rôle antioxydant, ils ont également des propriétés thérapeutiques, tel que la propriété anti-allergique, antiathérogène, anti-thrombotique, cardioprotecteur et vasodilatateurs (Balasundram et al., 2006). Par exemple, le Tripodion, (*Anthyllis tetraphylla* L.), est une plante de la famille des Fabacées qui est originaire du bassin méditerranéen (Tunis, Espagne, France méridionale et Italie) et est bien connue pour ses nombreuses utilisations dans la médecine traditionnelle. Elle est formée de feuilles, composées de quatre ou cinq folioles irrégulières. La taille de la foliole terminale est près de trois fois plus importante que celle des autres folioles. Sa fleur, au calice très renflé, a des étamines qui sont caractéristiques du genre (Nabli, 2011). À cet égard, nous visons avec cette étude à quantifier les composés phénoliques à partir des extraits méthanoliques foliaires et floraux de l'*Anthyllis tetraphylla* collectée en Tunisie, déterminer leur capacité antioxydante et, finalement, étudier leur pouvoir à retarder l'oxydation des lipides dans le système émulsion huile/eau.

2- Matériels et méthodes

2.1- Échantillonnage de la plante

L'*Anthyllis tetraphylla* a été récoltée au début du mois d'Avril 2016, correspondant à la période de floraison du site de Boukornine. Ce site appartient à l'étage bioclimatique semi-aride supérieur. Après leur séparation manuelle, chaque partie de l'*Anthyllis tetraphylla* (feuilles et fleurs) a été séchée à l'air libre pendant 20 jours, puis bien broyée en utilisant un mixeur. Enfin, la poudre homogène obtenue a été stockée dans des bouteilles en verre ambré à la température ambiante pour une utilisation ultérieure.

2.2- Préparation des extraits

Pour l'extraction, les différents extraits ont été obtenus en mélangeant 0,25 g de matière végétale sèche sous forme de poudre homogène dans 5 ml de méthanol 50% sous agitation pendant 24 h à 4°C, puis les extraits ont été filtrés et maintenus en réserve à 4°C jusqu'à une utilisation ultérieure. Pour tous les paramètres étudiés ci-dessous, les échantillons ont été analysés en trois exemplaires.

2.3- Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant la méthode de Singleton et Rossi (1965) légèrement modifiée et basée sur l'utilisation du Folin Ciocalteu comme réactif principal. Brièvement, 20 µl de chaque extrait dilué ont été ajoutés à 80 µl de réactif de Folin Ciocalteu (2N), 80 µl de Na₂CO₃ 20% et 80 µl d'eau bi distillée. Après mélange pendant 2 min, les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 765 nm contre un blanc, où les extraits ont été remplacés par l'eau distillée. L'acide gallique a été utilisé comme étalon pour la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g de MS).

2.4- Détermination de la teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée, comme décrite par Serra Bonvehí et al., (2001) avec quelques modifications comme suit : une quantité de 150 µl d'échantillon dilué a été mise en réaction, à l'abri de la lumière, avec 50 µl de AlCl₃ (20 mg/ml dans de l'acide acétique 5% préparé avec du méthanol 3: 1). Après 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 405 nm. Les DO obtenues ont été

comparées à une courbe d'étalonnage de Quercétine et les résultats ont été exprimés en milli moles d'équivalents de Quercétine par litre d'extrait végétal (mM EQ / L d'extrait).

2.5- Test ORAC

Suivant la méthode de Prior *et al.*, (2005), la capacité d'absorption des radicaux oxygénés a été réalisée à l'aide du spectrophotomètre Fluostar Omega équipé d'une chambre d'incubation à température contrôlée fixée à 37°C. Les valeurs de l'ORAC ont été exprimées en milli moles d'équivalents de Trolox par gramme de matière sèche (mM ET / g de MS).

2.6- Test TEAC

Le test TEAC a été basé sur la méthode standard de Re *et al.*, (1999). Pour réaliser ce test, le radical ABTS (7 mM) et le persulfate de potassium (24,24 mM) ont été préparés à l'avance et mélangés ensemble pour obtenir un volume final de 10 ml, puis la solution obtenue a été laissée se reposer à la température ambiante pendant 12 à 16 h à l'obscurité. La solution d'ABTS⁺ a été diluée avec 10 ml de PBS (pH 7,4) et incubée à 30 ° C. L'essai a été réalisé dans une microplaque en mélangeant la solution ABTS⁺ avec les extraits dilués. L'absorbance a été mesurée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde égale à 734 nm pendant 20 minutes. Les valeurs TEAC ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage de Trolox allant de 1 à 10 µM de TEAC et les résultats sont exprimés en micromoles de Trolox par gramme de matière sèche (µmole de Trolox/g MS).

2.7- Détermination de la valeur de peroxyde (VP)

Après la filtration de l'huile de tournesol et la préparation de l'émulsion, la valeur de peroxyde (VP) a été mesurée périodiquement et déterminée par la méthode de thiocyanate ferrique décrite par Frankel (1998) et le pH a été mesuré chaque deux jours à l'aide d'un pH mètre. Les valeurs de peroxyde sont exprimées en milliéquivalents par kg d'échantillons d'émulsion (de méq / kg).

3- Résultats et discussion

Parmi tous les constituants chimiques des végétaux, les composés phénoliques, s'ils n'occupent qu'une place quantitative modeste, ont de multiples propriétés qui ont, de tout temps, été recherchées par les êtres humains, (Macheix *et al.*, 2005). Plusieurs études récentes ont montré que les composés phénoliques constituent les principaux puissants composés antioxydants, (Ksouri *et al.*, 2008). Pour cette raison, ils sont utilisés dans de nombreux domaines incluant, par exemple, la médecine, la nutrition, les teintures et les produits cosmétiques. À ce sujet, la détermination des composés phénoliques des feuilles et fleurs de l'*Anthyllis tetraphylla* et l'étude de leur capacité antioxydantes ont été abordées afin d'évaluer la capacité de cette plante à synthétiser ces composés et apprécier leur pouvoir antioxydant.

Toutes les valeurs illustrées aux niveaux des figures et des tableaux sont la moyenne de 3 répétitions pour chaque partie de la plante étudiée.

3.1- Les composés phénoliques

La figure 1 illustre les résultats des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques foliaires et floraux de l'*Anthyllis tetraphylla*. Ces résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage d'acide gallique.

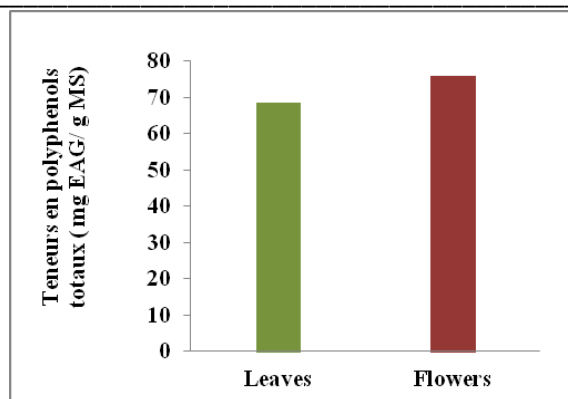


Figure 1 : Variations des teneurs en polyphénols totaux au niveau des extraits méthanoliques foliaires et floraux de l’*Anthyllis tetraphylla*

Après exploration de cette figure, on constate que les teneurs en polyphénols totaux au niveau de l’extrait des feuilles de l’*Anthyllis tetraphylla* se révèlent nettement proche de celles déterminées au niveau de l’extrait des fleurs, sauf que la partie florale présente la teneur la plus élevée estimée à 75.93 mg EAG/g MS, par contre la partie foliaire présente 68,54 mg EAG/g MS.

Pour le dosage des flavonoïdes, la Quercétine considérée comme contrôle positif, a permis de réaliser une courbe d’étalonnage à partir de laquelle on a calculé les teneurs en flavonoïde accumulées dans les feuilles et les fleurs. Les résultats sont illustrés dans la figure 2 et exprimés en milli mole d’équivalent de Quercétine par litre d’extrait méthanoliques (mM EQ/L extrait).

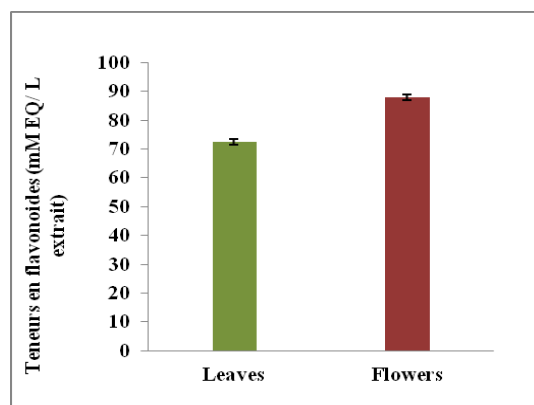


Figure 2 : Variations des teneurs en flavonoïdes au niveau des extraits méthanoliques foliaires et floraux de l’*Anthyllis tetraphylla*

D’après les histogrammes de la figure précédente, les feuilles et les fleurs de l’*Anthyllis tetraphylla* présentent des teneurs différentes en flavonoïdes. En effet, ce dernier contient une teneur en flavonoïdes plus élevée que celle de l’extrait foliaire estimée à 87.86 mM EQ/ alors que l’extrait des feuilles contient une teneur en flavonoïdes égale à 72.47 mM EQ/ g MS.

3.2- Activités antioxydantes

La capacité antioxydante des composés phénoliques étudiés a été déterminée suivant deux méthodes différentes, y compris les tests ORAC et TEAC. Leurs résultats sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Activités antioxydantes des extraits méthanoliques foliaires et floraux de l’*Anthyllis tetraphylla*

	ORAC (mM ET/g MS)	TEAC (µM ET/g MS)
Feuilles	86.88 ± 0.86	0.0087 ± 0.001
Fleurs	92.36 ± 0.2	0.13 ± 0.002

D’après le tableau 1, les plus fortes activités antioxydantes (ORAC et TEAC) ont été observées dans l’extrait des fleurs avec des valeurs égales à 92.36± 0.2 mM TE/g MS et 0.13± 0.002 µM TE/g MS

respectivement, tandis que les extraits de feuilles ont présenté les activités les plus faibles estimées à 86.88 ± 0.86 mM ET/g MS et 0.0087 ± 0.001 μ M ET/g MS respectivement.

Dans notre étude, nous nous sommes aussi intéressés par l'étude des effets antioxydants des composés phénoliques sur l'oxydation des lipides dans les systèmes alimentaires. Dans notre étude, et comme le montre la figure 3, les extraits des fleurs de l'*Anthyllis tetraphylla* ont été plus efficaces pour retarder l'oxydation des lipides dans le système d'émulsion plus que l'extrait des feuilles.

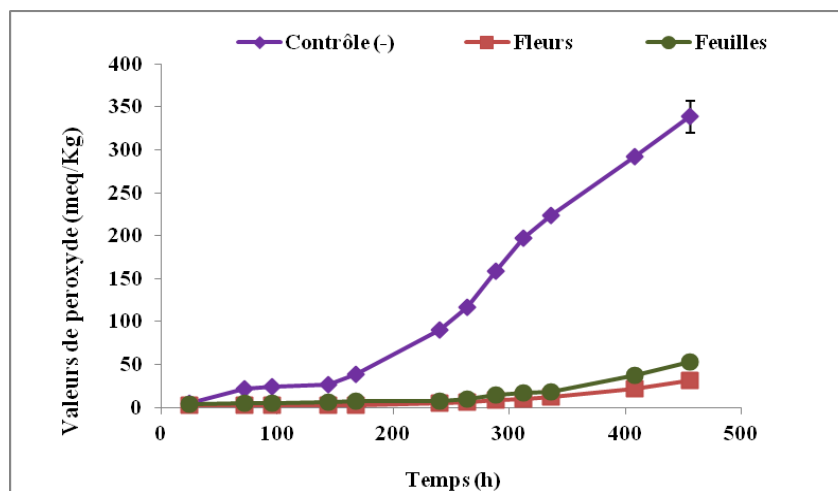


Figure 3 : Evaluation de l'oxydation des lipides au niveau du système d'émulsion (huile/ eau) en fonction du temps

En examinant la figure 3, on constate que la formation de l'hydroperoxyde a été significativement plus rapide dans le contrôle négatif qui ne contient pas d'antioxydant et a atteint 338.57 ± 18.79 méq/kg après 456h (~ 19 jours). De l'autre côté et par rapport à l'extrait des feuilles, l'extrait des fleurs a conservé approximativement la stabilité de l'émulsion jusqu'à 336h (environ 14 jours) avec une valeur de peroxyde estimée à $11.74 \pm 0,48$ méq/kg, tandis que l'extrait de feuille présente moins de prévention estimée à $17,19 \pm 0.64$ méq/kg après la même période de temps.

En résumé, la répartition inégale des quantités en composés phénoliques entre les feuilles et les fleurs et leurs pouvoirs antioxydants peut être expliquée par le fait que la présence de ces composés peut être profondément affectée par différents facteurs qui peuvent être environnementaux (nature du sol, étage bioclimatique, climat, etc.), techniques (nature du solvant) et biologique (stade végétatif, maturité) (Ksouri et al., 2008).

4- Conclusions

Dans la présente étude, les teneurs les plus élevées en composés phénoliques et les activités antioxydantes les plus fortes ont été déterminées dans des extraits floraux préparés avec le méthanol 50% utilisé comme solvant d'extraction. Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation entre la teneur en composés phénoliques et la capacité antioxydante des extraits méthanoliques de l'*Anthyllis tetraphylla*. Cela peut être lié aux composants chimiques présents dans les différentes parties de cette plante sauvage, en particulier les flavonoïdes qui représentent le composé le plus important. Cette étude montre également que la poudre sèche des feuilles et des fleurs a présenté un effet positif sur la retardation de l'oxydation des lipides dans le système d'émulsion composée d'huile et d'eau. Comme ils ont retardé l'oxydation de l'émulsion, les fleurs sont considérées plus efficaces que les feuilles. Pour résumer, l'*Anthyllis tetraphylla* peut être utilisée comme un antioxydant naturel pour conserver les produits et les aliments contenant des lipides.

Remerciements

Les auteurs tiennent à exprimer leur sincère gratitude à M. Mounir Kasri pour son service constructif pour la recherche de la plante étudiée.

Références bibliographiques

- Balasundram N, Sundram K, Samman S. (2006) : Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**, 191–203.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition reviews*, **56**, 317–333.
- De La Calle I, Costas M, Cabaleiro N, Lavilla I, Bendicho C. (2013) : Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, **138**, 234–241.
- Frankel EN. (1998) : Methods to determine extent of oxidation. *Lipid Oxidation*. The Oily Press. Glasgow, Scotland, United Kingdom.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. (2002) : Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572-584.
- Kim MB, Park JS, Lim SB. (2010) : Antioxidant activity and cell toxicity of pressurized liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. *Food Chemistry*, **122**, 546-552.
- 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**, 865 – 873.
- Lubbe A, Verpoorte R. (2011) : Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, **34**, 785–801.
- Macheix JJ, Annie F, Christian JA. (2005) : Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires Romandes*, 192p.
- Nabli MA. (2011) : La mise à jour de la flore de la Tunisie. *Centre de publication universitaire*, Tunis, Tunisie, 588p.
- Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA. (2000) : Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, **30**, 379-384.
- Pienitz S, Colpo E, Oliveira VR, Stefanel V, Andrezza R. (2009) : In vitro assessment of the antioxidant potential of fruits and vegetables *Ciência E Agrotecnologia*, **33**, 552–559.
- Prior R, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4290–4302.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999) : Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, **26**, 1231-1237.
- Serra Bonvehi J, Soliva Torrento M, Centelles Lorente E. (2001) : Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1848-1853.
- Singleton V, Rossi JA. (1965) : Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144–158.
- Smith-Hall C, Larsen HO, Pouliot M. (2012) : People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **8**, 43.