

Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.)

I. BETTAIEB REBEY*, J. SRITI, B. BESBESS, K. MKADDMINI HAMMI, I. HAMROUNI SELLAMI, B. MARZOUK, R. KSOURI

Laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

*Corresponding author: rosainess@yahoo.fr

Abstract - Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds of two geographic origins, Tunisia and India (IFS), were studied regarding their phenolic content and antioxidant potentialities. Seed phenolic contents and antioxidant activity appeared to be accession and solvent dependent. Extraction with 60% ethanol led to the highest polyphenol and flavonoid contents, respectively for Tunisian fennel seeds and Indian fennel seeds. DPPH scavenging activity, chelating ability and reducing power were maximal in 60% ethanol for both Tunisian and Indian fennel seeds. HPLC analysis revealed several phenolic compounds in *F.vulgare* seeds, with quercetin-3-O-rutinoside as major phenolics in Tunisian and Indian fennel seeds, respectively. Thus, phenolic composition of fennel seeds is also origin dependent. The overall results suggest the exploitation of fennel seeds as a low-cost renewable source for industrial processing in the fields of food industries and pharmaceuticals.

Keywords: *Foeniculum vulgare* Mill, phenolic, solvent, provenance, antioxidant activity.

Résumé - Les graines de fenouil d'origine tunisienne et Indienne ont été étudiées quand à leur contenu en polyphénols et leur potentialités antioxydantes. Nos résultats ont permis de montrer que le solvant d'extraction ainsi que la provenance affectent significativement les teneurs des graines de *F.vulgare* en composés phénoliques, polyphénols totaux et flavonoïdes ainsi que les activités antioxydantes. Un effet bénéfique a été obtenu par l'addition de 40% d'eau à ces solvants (éthanol, acétone et méthanol), ce qui a permis une meilleure extraction quantitative des composés phénoliques et une activité antioxydante plus importante. Parmi les solvants à 60%, l'éthanol est le plus recommandé dans ce type d'extraction. De plus, les extraits de la variété locale sont doués d'une activité antioxydante plus intéressante par rapport à celle de la variété Indienne avec une différence significative entre les deux. La quercétine-3-O-rutinoside, composé phénolique majeur détecté dans les graines de fenouil locales, contribue aux activités antioxydantes élevées de cette espèce. Ceci suggère l'importance de l'utilisation des extraits de graines de fenouil comme une nouvelle source naturelle d'additifs alimentaires et d'antioxydants puissants en industries alimentaires.

Mots clés: *Foeniculum vulgare* Mill, polyphénols, solvant, provenance, activité antioxydante

1. Introduction

Par sa position géographique, la Tunisie jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse tels que le climat et le sol auxquels s'ajoutent les ressources en eau et l'ensoleillement qui sont tous favorables au développement de cultures intensives des plantes aromatiques et médicinales. Ces plantes renferment des biomolécules pouvant être utilisées en alimentation (arômes), en parfumerie (molécules odorantes), en phytothérapie (principes actifs) ou en cosmétique (substances traitant la peau et les cheveux) (Chemli, 1997). Parmi ces plantes on cite le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill) qui est une épice d'utilisation médicinale et culinaire très importante (Hendawy et al. 2010). Le fenouil est communément appelé en arabe "besbes". Actuellement, une grande attention est accordée aux produits naturels, ce qui explique sans doute les efforts exercés par la communauté scientifique dans les buts d'isolement, d'identification et de valorisation de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique et



économique. De plus, les substances naturelles sont connues par leur richesse en antioxydants qui peuvent être utilisés dans les aliments pour prévenir le rancissement et l'oxydation des lipides. Les composés phénoliques constituent un des groupes phytochimiques les plus importants chez les végétaux pour la morphologie et la physiologie de la plante (Sarni Manchado et Cheynier, 2006). La composante phénolique des végétaux est constituée d'une variété de structures représentant la majorité des classes phénoliques (Balasundram et al. 2006). La combinaison des différentes structures, leurs proportions relatives ainsi que leurs interactions (synergisme ou antagonisme) sont à l'origine de la diversité de leurs activités biologiques (Rice-Evans et al. 1996). Une modification du répertoire phénolique, sous l'influence d'un facteur ou d'un autre, pourrait être à l'origine de la modification des propriétés biologiques caractéristiques d'un végétal. En effet, la biosynthèse des composés phénoliques est fonction de plusieurs paramètres qu'ils soient d'ordre intrinsèques ou extrinsèques (Toor et al. 2006; Trabelsi, 2007; Ksouri et al. 2008; Tsai et al. 2008). Généralement, le solvant utilisé pour l'extraction des polyphénols est choisi selon le but de l'extraction, la nature des composants dosés, les propriétés physico-chimiques de la matrice, la disponibilité des réactifs et des équipements, le coût et les préoccupations en matière de sécurité (Yu et al. 2002). Dans ce contexte, deux variables (la provenance et le solvant d'extraction) ont été utilisées pour étudier la teneur en polyphénols des graines de *F. vulgariae* ainsi que leurs potentialités antioxydantes.

2. Matériels et methods

2.1 Origine du matériel végétal

Les graines de fenouil d'origine tunisienne (GFT) utilisés dans ce travail proviennent de plantes cultivées en plein champ par un agriculteur de la localité d'El Gobba de la région de Menzel Temime au mois de Juillet 2014. Les graines de fenouil d'origine Indienne (GFI) *utilisées dans ce travail ont été achetées auprès d'un grossiste et provenant de l'Inde*. Les graines ont été séchées à l'ombre. Ensuite elles sont finement broyées et conservées dans un dessiccateur jusqu'au moment de l'analyse.

2.2 Extraction par macération

Cette extraction a été faite selon la méthode de Mau et al. (2001), en mélangeant 2,5 g de matière végétale sèche avec 25 ml du solvant choisi (Ethanol, Acétone, Méthanol, Eau, Ethanol 60%, Acétone 60% et Méthanol 60%). Le mélange est agité pendant 30 min et gardé au repos pendant 24 heures à 4°C en obscurité. Enfin, ce mélange est filtré sur du papier Wattman N°4 sans cendre. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C pour les différentes analyses.

2.3 Dosage des polyphénols totaux

Une prise de 125 µl de l'extrait dilué 10 fois est mélangée avec 500µl d'eau distillée et 125µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3min, une prise de 1250 µl de $\text{CO}_3(\text{Na})_2$ à 7 % est additionnée. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml. Après un repos de 90 min à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm. La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variant de 50 à 500 mg.l⁻¹. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹ MS).

2.4 Dosage des flavonoïdes totaux

Une prise de 0.25 ml de chaque extrait dilué 5 fois a été additionnée de 0.075 ml de NaNO_2 (5%). Le mélange est laissé pendant 6 min avant d'ajouter 0,15 ml de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 6H₂O, 10%) fraîchement préparé. Une seconde incubation de 5 min à une température ambiante est effectuée, suivie de l'ajout de 0.5 ml de NaOH (1M). Le mélange est par la suite ajusté avec de l'eau distillée à un volume final de 2,5 ml. La lecture de l'absorbance a été faite à 510 nm. La gamme étalon est préparée avec de la catéchine à des concentrations croissantes allant de 50 à 500 mg.l⁻¹. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC.g⁻¹ MS).

2.5 Identification de composés phénoliques par RP-HPLC

Les échantillons des graines sont hydrolysés selon la méthode de Proestos et al. (2006). Pour cela, à 0,5 g de matière sèche on ajoute 40 ml d'acétone et 10 ml d'une solution de HCl 6M. Après agitation

vigoureuse, on procède à une sonication pendant 15 min. La solution obtenue est ensuite chauffée à reflux pendant 2 h à 90°C, puis concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif. On procède ensuite à une filtration à l'aide d'une membrane filtrante de 0,45µm avant l'analyse par CLHP-PR.

L'analyse et la séparation des composés phénoliques a été faite par chromatographie liquide à haute performance et en phase inverse à l'aide d'un appareil (CLHP-RP) du type Agilent Technologies 1100, muni d'un détecteur UV visible à longueur d'onde variable et équipé d'une colonne du type C18 Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 4 µm), à la température ambiante.

La phase mobile est composée comme suit: solvant A: acetonitrile et solvant B: H₂O à 0,2% acide sulfurique. Le gradient d'élution choisi est comme suit:

15% A/ 85% B 0-12 min, 40% A/ 60% B 12-14min, 60% A/ 40% B 14-18min, 80% A/ 20% B 18-20min, 90% A/ 10% B 20-24min, 100% A 24-28 min.

Le débit est maintenu à 0,5 ml/min et le volume d'injection est de 20 µl.

L'identification des pics a été réalisée par Co-injection de témoins purs d'acides phénoliques et de flavonoïdes dans les mêmes conditions analytiques. La quantification des composés phénoliques a été faite en utilisant la rutine comme étalon interne.

2.6 Mesure de l'activité antioxydante

2.6.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1 picrylhydrazole (DPPH)

Selon la méthode de Hanato et al. (1988), une prise d'essai de 1ml de l'extrait à différentes concentrations (0.125; 0.250; 0.5; 5; 10; 20 mg.ml⁻¹) est mise en présence de 250 µl d'une solution de DPPH. (0.2mM dans le méthanol). Le mélange demeure pendant 30 min au repos et à l'obscurité pour incubation, ensuite l'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible contre un témoin (sans extrait). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange selon l'équation:

$$PI = (DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) * 100 \quad (1)$$

PI: pourcentage d'inhibition (ou CI₅₀)

DO témoin: absorbance du témoin

DO extrait: absorbance de l'extrait

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI₅₀), la valeur de CI₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée.

2.6.2 Mesure du pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode décrite par Oyaizu (1986). Cette méthode consiste à mélanger 1ml de l'extrait à différentes concentrations (0,1 à 1,5 mg.ml⁻¹) avec 2.5ml de tampon phosphate (0,2 mol.l⁻¹, pH 6,6) et 2,5 ml de K₃Fe(CN)₆ (1%). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 min à 50°C. Après cette incubation, 2,5 ml de TCA (10%) sont additionnés pour arrêter la réaction, suivie d'une centrifugation à 650 x g pendant 10 min à la température ambiante. Enfin, 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml FeCl₃ (0,1%) sont additionnés au surnageant (2,5 ml). La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm (le blanc est le tampon d'extraction). Le témoin positif est l'acide ascorbique ou le BHA (0,01-1 mg.ml⁻¹). Les résultats sont exprimés en concentration efficace (CE₅₀, µg.ml⁻¹) qui est la concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0,5. La valeur de CE₅₀ est obtenue par interpolation de la courbe de régression linéaire (Mau *et al.*, 2004).

2.6.3 Mesure du pouvoir chélateur

Selon Zhao et al. (2006), 100 µl de l'extrait préparé à différentes concentrations (0,01 à 10 mg/ml) est additionné de 50 µl d'une solution de 2 mM FeCl₂. La réaction est initiée en ajoutant 100 µl d'une solution de ferrozine (5 mM) et 2750 µl d'eau distillée. Le mélange est agité vigoureusement puis incubé à la température ambiante pendant 10 min. L'absorbance est ensuite mesurée à 562 nm.

Le pourcentage d'inhibition (PI) de la formation du complexe Fe²⁺ /ferrozine est calculé selon cette formule:

$$PI = [(A_T - A_E) / A_T] \times 100$$

Où A_T est l'absorbance de la solution contrôle (sans extrait) et A_E l'absorbance en présence de l'extrait. L'étude de la variation du pouvoir chélateur en fonction de la concentration de l'extrait permet de déterminer la CI₅₀: la concentration de l'extrait à l'origine d'une inhibition de 50%.

2.7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en exploitant un logiciel STATISTICA où le test de DUNCAN est utilisé au seuil de significativité de $p < 0.05$.

3. Résultats et discussion

3.1 Dosage des polyphénols totaux

Dans notre travail, le contenu en polyphénols totaux des différents extraits a été déterminé par un dosage colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Une courbe d'étalonnage a été établie avec l'acide gallique. L'examen des résultats obtenus dans le tableau 1 montre que les extraits des graines de *F. vulgarae* possèdent des teneurs en phénols totaux significativement différentes en relation étroite avec la provenance et la nature du solvant d'extraction utilisé. Le méthanol 60% présente le meilleur pouvoir extractant, ce qui a permis d'obtenir les teneurs phénoliques les plus élevées (6,90 et 5,14 mg EAG.g⁻¹ MS, respectivement pour GFT et GFI), suivi par l'eau (2,09; 1,44 mg EAG.g⁻¹ MS respectivement pour GFT et GFI). Les plus faibles pouvoirs extractants ont été obtenus par l'acétone, le méthanol et l'éthanol purs pour les deux variétés GFT et GFI dont les teneurs sont respectivement pour l'acétone (0,25; 0,55 mg EAG.g⁻¹ MS), le méthanol (0,67; 0,33 mg EAG.g⁻¹ MS) et l'éthanol (0,06; 0,02 mg EAG.g⁻¹ MS) respectivement pour la variété de fenouil locale et Indienne. Les solvants utilisés peuvent être classés selon un pouvoir extractant décroissant comme suit: méthanol 60%, eau, éthanol 60%, acétone 60%, méthanol, acétone, et éthanol. En outre, l'addition de 40% d'eau distillée aux solvants purs l'acétone, méthanol et l'éthanol a montré une amélioration des pouvoirs d'extractions des composés phénoliques des organes photosynthétiques. Ceci montre la différence qualitative et quantitative due à la polarité des molécules donc dans leur extractibilité par les divers solvants. D'autre part, la variation de la concentration du solvant (mélange à différentes proportions avec l'eau distillée) modifie la capacité d'extraction et contribue à améliorer cette capacité du solvant à extraire plus de composés (Spigno et al. 2007). La comparaison des teneurs en composés phénoliques a révélé également des différences significatives entre les deux provenances étudiées. En effet, les extraits de graines Tunisiennes présentent des teneurs plus élevées en ces métabolites que les graines Indiennes et ceci indépendamment du solvant d'extraction utilisé. Nos résultats corroborent les travaux de Bettaieb Rebey et al. (2011) qui ont analysé la composition phénolique de deux provenances de *Cuminum cyminum* et ont trouvé que les différences des teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés totaux sont significatives entre les deux provenances.

Tableau 1. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits des graines de *F. vulgarae*

	Polyphénols (mg GAE.g ⁻¹ DW)		Flavonoïdes (mg CE. g ⁻¹ DW)	
	GFT	GFI	GFT	GFI
Methanol (60%)	6.90±0.33 ^{aA}	5.14±0.02 ^{bA}	11.68±0.01 ^{aA}	09.42±0.03 ^{bA}
Acetone (60%)	0.47±0.03 ^{aC}	0.55±0.01 ^{aC}	8.93±0.08 ^{aB}	7.51±0.02 ^{abB}
Ethanol (60%)	1.95±0.03 ^{aB}	1.07±0.02 ^{bB}	9.60±0.01 ^{aB}	7.33±0.02 ^{bB}
Methanol	0.67±0.34 ^{aC}	0.33±0.77 ^{bC}	578±0.02 ^{aC}	5.42±0.11 ^{aC}
Acetone	0.25±0.02 ^{aC}	0.59±0.01 ^{aC}	879±0.03 ^{aB}	6.20±0.31 ^{bC}
Ethanol	0.06±0.02 ^{aD}	0.02±0.06 ^{aD}	5.57±0.01 ^{aC}	4.16±0.07 ^{abD}
Eau	2.09±0.01 ^{aB}	1.44±0.01 ^{aB}	4.13±0.01 ^{aC}	2.17±0.02 ^{bE}

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes. (Les lettres minuscules pour le solvant d'extraction et les lettres majuscules pour la provenance).

3.2 Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'une des classes de polyphénol les plus étudiées. Le contenu en flavonoïdes des extraits a été évalué par un dosage colorimétrique. Une courbe étalon a été préparée avec la catéchine et les résultats sont exprimés en équivalent catéchine. Comme pour les polyphénols, les extraits de la graine de *Foeniculum vulgare* Mill montrent des teneurs variables en flavonoïdes qui dépendent

également de la polarité du solvant d'extraction et de la provenance (Tableau 1). L'effet du solvant sur la solubilité des flavonoïdes totaux a montré approximativement la même classification pour les polyphénols totaux. Cependant, ces teneurs sont plus élevées que celles des polyphénols totaux et varient de 11,68 à 4,13 mg EC/g de MS pour GFT et de 9,42 à 2,17 mg EC/g de MS pour GFI, respectivement, pour l'extrait méthanolique à 60% et l'extrait aqueux. De ce fait, comme dans le cas des polyphénols totaux, l'addition d'un pourcentage d'eau distillée aux solvants purs (éthanol, méthanol et acétone) permet une nette augmentation de leurs pouvoirs d'extraction des flavonoïdes (Robards et Antolovich 1997). D'autre part, les analyses statistiques ont montré des différences significatives en ce qui concerne la teneur en flavonoïdes totaux des deux accessions. En effet, GFT exprime une supériorité de l'ordre de 20% par rapport à GFI pour l'extrait méthanolique à 60%.

4. Estimation des activités antioxydantes des différents extraits de la graine

Les composés phénoliques sont connus pour leurs activités biologiques diverses notamment antioxydantes. Pour cela, trois tests d'activités: la capacité de dégradation du DPPH, le pouvoir réducteur du fer ainsi que le pouvoir chélateur, ont été réalisés dans le but de déterminer la capacité antioxydante des extraits de la graine de *F. vulgariae*.

4.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

Afin de déterminer le solvant le plus approprié pour déterminer une activité antioxydante optimale, nous avons utilisé pour estimer l'activité antiradicalaire (test DPPH) soit des solvants purs soit des différents mélanges de solvants. Les résultats obtenus ont montré que la nature du solvant a un effet significatif sur la capacité antiradicalaire de fenouil (Figure 1). Les valeurs des CI_{50} varient de 21,33 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait éthanolique à 60% à 977 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait acétonique. Les extraits éthanolique à 60% ont exhibé la capacité la plus élevée à réduire le radical DPPH avec des valeurs de CI_{50} atteignant 21,33 et 67,24 $\mu\text{g/ml}$ respectivement pour les graines Tunisiennes et les graines Indiennes. Le méthanol à 60% est le deuxième système approprié avec des CI_{50} de 76,67 et 96,47 $\mu\text{g/ml}$, suivi de l'acétone 60% avec des CI_{50} de 133,33 et 201 $\mu\text{g/ml}$ respectivement pour les GFT et les GFI, respectivement. Les valeurs des CI_{50} relatives à l'utilisation de l'acétone, l'éthanol et le méthanol à l'état pur, sont supérieures à 200 $\mu\text{g/ml}$. L'activité antiradicalaire la plus faible a été enregistrée dans les extraits acétoniques des graines de fenouil avec des CI_{50} de 833,33 et 977 $\mu\text{g/ml}$ respectivement pour les graines Tunisiennes et les graines Indiennes. Ces résultats montrent que les extraits obtenus avec des solvants aqueux sont plus indiqués pour l'extraction d'antioxydants à partir des graines de fenouil. Plusieurs études ont prouvé que l'addition d'eau à de faibles taux au solvant améliore l'extraction des antioxydants puissants (Turkmen et al. 2006; Zhao et al. 2006). En outre, GFT exprime les meilleures activités antioxydantes avec des CI_{50} les plus faibles, indépendamment du solvant d'extraction utilisée. Dans ce contexte, Bettaieb Rebey et al. (2011) ont montré l'existence d'un effet marqué de la provenance sur les potentialités antioxydantes des graines de cumin Tunisienne et Indienne. En effet, l'étude de l'impact de la provenance correspond à une approche très globale mettant en évidence l'impact d'un complexe de facteurs environnementaux en interaction. En l'absence de caractérisation climatique des régions, il est difficile d'attribuer ces différences à tel ou tel facteur de l'environnement aérien ou édaphique (Dragovic-Uzelac et al. 2007). L'analyse des résultats (teneurs en polyphénols et activité antiradicalaire) montre que l'addition de 40% d'eau distillée à chacun des trois solvants d'extraction à l'état pur (éthanol, acétone et méthanol) exalte la capacité antioxydante des extraits de graines de fenouil, notamment en ce qui concerne l'activité antiradicalaire. Pour cela, l'efficacité de ces extraits de graine de fenouil (à partir de chacun des trois solvants à 60%) a été testée vis-à-vis du pouvoir réducteur du fer et du pouvoir chélateur, ceci afin de sélectionner le meilleur solvant d'extraction qui sont dans notre cas les trois solvants à 60%.

4.2 Effet des trois solvants sélectionnés sur les pouvoirs chélateurs et réducteurs du fer

Afin de choisir les solvants appropriés pour l'extraction des composés phénoliques de *F. vulgariae*, les trois solvants sélectionnés ont été évalués par des activités antioxydantes complémentaires (les pouvoirs chélateurs et réducteurs du fer).

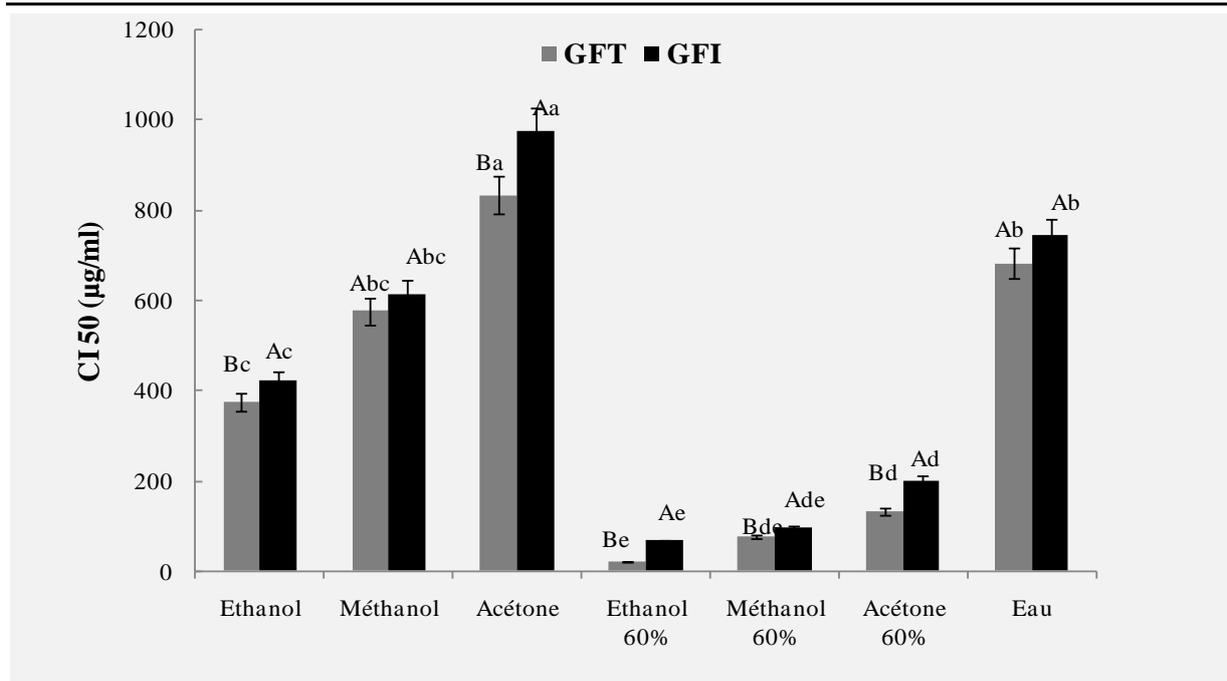


Figure 1. Activité antiradicalaire (CI₅₀ en µg.ml⁻¹) des extraits de graines de *F. vulgarae* d'origine Tunisienne et Indienne. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes. (Les lettres minuscules pour le solvant d'extraction et les lettres majuscules pour la provenance).

5. Mesure du pouvoir réducteur du fer

Dans le but d'évaluer la capacité de réduction des ions métalliques tels que le fer, la mesure du pouvoir réducteur de la graine de *F. vulgarae* en fonction de la provenance et du solvant d'extraction a été réalisée. Pour cela, l'activité réductrice du fer est estimée par la concentration efficace (CE₅₀) qui correspond à une absorbance égale à 0,5. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. Les valeurs de CE₅₀ présentées dans le tableau 2 montrent que les graines de fenouil ont des activités réductrices qui diffèrent significativement selon la provenance et le solvant d'extraction.

La capacité réductrice d'un extrait dépend de la présence de réductones qui exercent leur activité antioxydante grâce aux réactions de transfert d'électron. De plus, les réductones peuvent réduire la formation des peroxydes d'hydrogène (Singh et Rajini, 2004). Ceci indique que les différents extraits sont capables d'agir comme donneurs d'électrons stabilisant les radicaux et bloquant par conséquent leur production en chaîne.

Tableau 2: Pouvoirs chélateur et réducteur du fer des extraits de graines de *F. vulgarae*

		Pouvoir chélateur (CI ₅₀ mg.ml ⁻¹)	Pouvoir réducteur (CE ₅₀ µg.ml ⁻¹)
Ethanol 60%	GFT	1.11 ^{dA}	49 ^{dA}
	GFI	2.17 ^{dB}	55 ^{dAB}
Méthanol 60%	GFT	172 ^{cA}	107 ^{bA}
	GFI	177 ^{cA}	204 ^{bB}
Acétone 60%	GFT	120 ^{bA}	88 ^{cA}
	GFI	189 ^{bB}	102 ^{cAB}
Acide ascorbique		-	40
EDTA		0.03	-

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes. (Les lettres minuscules pour le solvant d'extraction et les lettres majuscules pour la provenance).

6. Mesure du pouvoir chélateur

Le pouvoir chélateur du fer est évalué par l'utilisation du complexe le plus stable, la ferrozine qui forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel un complexe ferrozine Fe^{2+} et également par l'absorbance qui renseigne sur la qualité du fer non chélaté ainsi que sur la capacité des extraits à piéger cet élément afin de nous permettre d'atteindre la concentration inhibitrice CI_{50} d'où l'extrait provoque 50% de chélation de fer. En effet, les valeurs de CI_{50} faibles correspondant à une activité antioxydante forte pour les extraits testés de *F.vulgarae*. Les résultats de la détermination de l'activité antioxydante de différents extraits à l'aide de la méthode du pouvoir chélateur du fer sont présentés dans le tableau 2. Les extraits méthanoïques à 60% des GFT et GFI possèdent les pouvoirs chélateurs des ions ferreux les plus élevés et présentent des CI_{50} de l'ordre de 1,11 et 2,17 mg/ml.

Les agents chélateurs agissent en formant des liaisons avec l'ion métallique réduisant son potentiel redox (Kumaran et Joel-Karunakaran, 2007). En effet, la chélation des ions ferreux est importante dans la mesure où ces derniers participent à la formation des radicaux hydroxyles, très néfastes, lors de la réaction de Fenton :



6.1 Identification des composés phénoliques

Une modification du répertoire phénolique, sous l'influence d'un facteur ou d'un autre, pourrait être à l'origine de la modification des propriétés biologiques caractéristiques d'un végétal. Nos résultats sur la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante corroborent cette idée. Ils ont témoigné de l'importance des différents facteurs tels que l'origine et la nature du solvant d'extraction sur la composition phénolique de la graine de fenouil. En effet, la variété locale a exprimé les meilleures potentialités antioxydantes. Ce fait justifie son choix pour le reste du travail qui cible l'identification qualitative, par RP-HPLC, de la variabilité de sa composition phénolique en fonction du solvant d'extraction utilisée. Cette identification de la composition phénolique est une originalité de ce travail puisqu' aucune étude antérieure ne l'a rapportée chez cette espèce. L'analyse des résultats des différents profils chromatographiques (Figure 2) des principaux composés phénoliques obtenus à partir des extraits de macération obtenus par des solvants solvants à 60%, nous a permis d'identifier six composés phénoliques dont 3 flavonoides: la quercétine-3-O rutinoside qui est le composé majeur dans les deux extraits éthanolique et méthanolique (4,13 et 2,59 mg/g résidu), la luteolin 7-O glucoside et l'apigénine . Le reste des composés identifiés est constitué d'acides phénoliques: acide gallique, acide chlorogénique et acide ferulique. Certains pics de ces profils ne sont pas identifiés par manque de standards qui leur correspondent parmi ceux utilisés pour l'identification de ces composés phénoliques. D'autre part, l'analyse comparative des profils chromatographiques des extraits de macération des GFT a permis de dégager des différences au niveau des teneurs des composés phénoliques relatives au solvant d'extraction (Tableau 3). Cette variabilité entre les différents solvants d'extraction pourrait être à l'origine de la différence des capacités antioxydantes entre les trois extraits. En effet, la quercétine-3-O rutinoside qui est le composé majeur dans les deux extraits éthanolique et méthanolique est connu par son fort pouvoir antioxydant et intervient dans la protection des plantes contre la photo-oxydation (Dobashi et al. 2008). Ceci pourrait justifier la capacité antioxydante importante qu'exhibe l'extrait éthanolique à 60%.

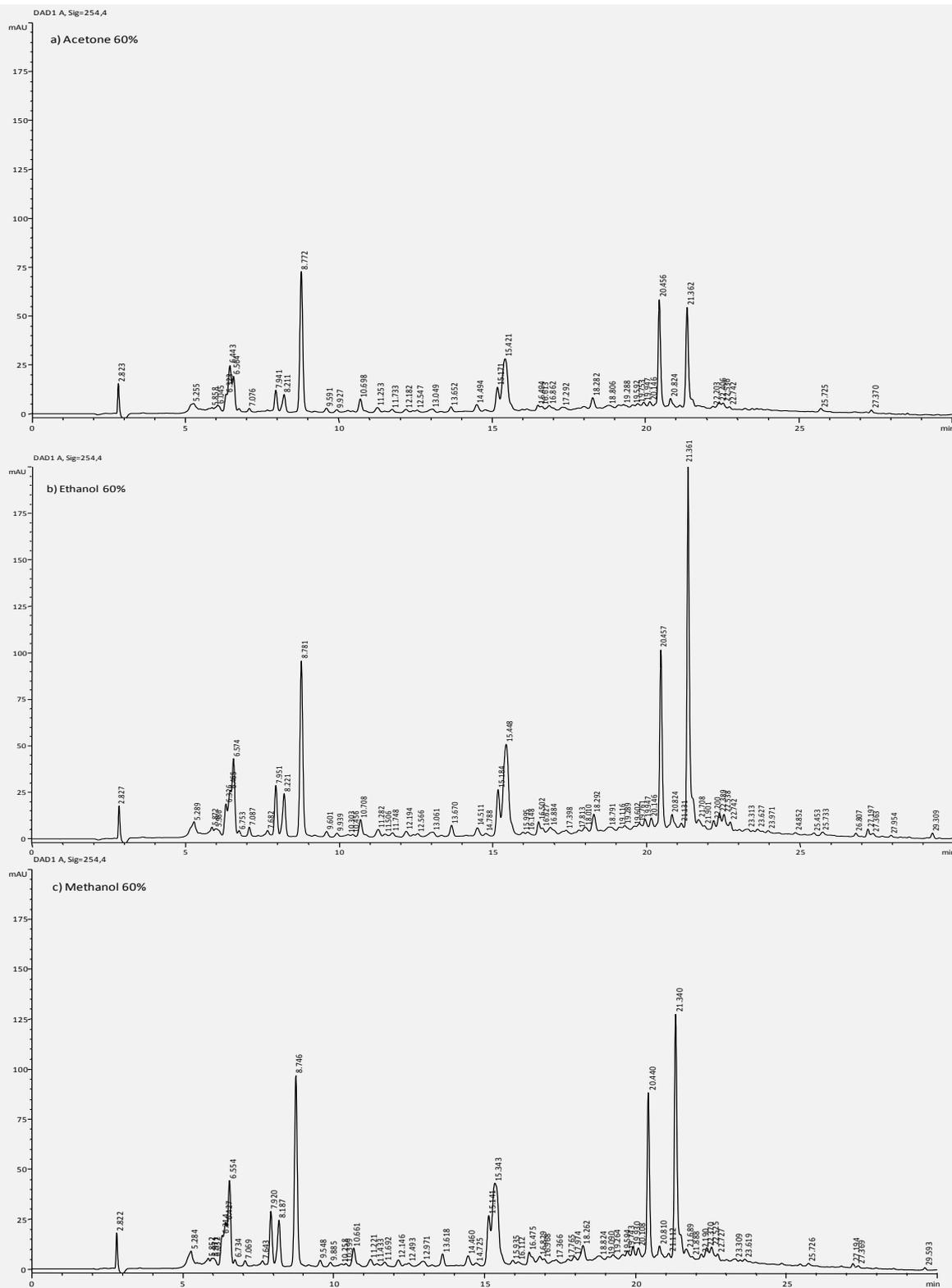


Figure 2. Profils chromatographiques des composés phénoliques des extraits (Acétone 60%, éthanol 60% et méthanol 60%) des GFT enregistrés en UV à 254 nm.

Tableau 3. Données relatives à l'analyse par HPLC des composés phénoliques à partir de chacun des trois solvants à 60% (éthanol, acétone et méthanol).

Temps de rétention (min)	Aire	Identification	Quantification
Acétone 60%			
7.941	68	Acide gallique	0.267
15.421	353.6	Acide Chlorogenic	1.604
20.146	13.2	Acide ferulique	0.083
20.824	31.8	Luteolin 7-O glucoside	0.242
21.362	327.2	Quercetine -3-O rutinoside	1.046
25.725	14.2	Apigenine	0.027
Ethanol 60%			
7.951	166.5	Acide gallique	0.655
15.448	614.5	Acide Chlorogenic	2.789
20.146	27.3	Acide ferulique	0.173
20.824	52.4	Luteolin 7-O glucoside	0.399
21.361	1293.2	Quercetine -3-O rutinoside	4.132
25.733	17.5	Apigenine	0.034
Méthanol 60%			
7.920	170.6	Acide gallique	0.671
15.343	594.7	Acide Chlorogenic	2.699
20.108	29.8	Acide ferulique	0.189
20.810	41.8	Luteolin 7-O glucoside	0.318
21.340	812.2	Quercetine -3-O rutinoside	2.595
25.726	10	Apigenine	0.019

7. Conclusion

Les différents extraits des graines de *F. vulgarae* L. renferment des teneurs très variables en composés phénoliques et par conséquent ont des activités antioxydantes différentes. Ces teneurs en composés varient en fonction de la provenance et de nature des solvants d'extraction. Un effet bénéfique a été obtenu par l'addition de 40% d'eau à ces solvants (éthanol, acétone et méthanol), ce qui a permis une meilleure extraction des composés phénoliques et une activité antioxydante importante. Parmi les solvants à 60%, l'éthanol est le plus recommandée dans ce type d'extraction. Les extraits méthanoliques à 60% de *F. vulgarae* peuvent être considérés comme des sources alternatives d'antioxydants naturels qui sont même plus efficaces que les antioxydants synthétiques (BHT, EDTA, acide ascorbique). Cette activité est suffisamment importante pour permettre l'utilisation de la plante de fenouil comme une nouvelle source naturelle d'additifs alimentaires et d'antioxydants puissants en industrie alimentaire.

En conclusion, il convient de dire que malgré que les teneurs en composés phénoliques constituent un facteur de valorisation de la capacité antioxydante des espèces végétale, la qualité de ces molécules serait beaucoup plus intéressante puisqu'elle détermine l'ampleur de leurs propriétés biologiques

8. Références

- Balasundram, N, Sundram K., Samman S (2006)** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99: 199-203.
- Bettaieb Rebey I, Bourgou S, Ben Slimen Debbez I, Jabri-Karoui I, Hamrouni-Sellami I, Msaada K, Limam F, Marzouk B (2011)** Effects of extraction solvent and provenances on phenolic contents and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Food Biop Technol* 5:2827-283.
- Chemli R(1997)** Plantes médicinales et aromatiques de la flore de la Tunisie. In "Identification of wild food and non-food plants of the mediterranean region", Heywood V.H., Skoula M., Eds., Chania: *CIHEAM-IAMC*, 119-125.
- Dragovic-Uzelac V, Levaj B, Mrkic V, Bursac D, Boras M (2007)** The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chem* 102: 966-975.
- Hanato T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T (1988)** Two new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effect. *Chem Pharm Bull* 36: 1090-1097.
- Hendawy SF, Ezz El-Din AA (2010)** Growth and yield of *Foeniculum vulgare* var. *azoricum* as influenced by some vitamins and amino acids. *Ozean J Appl Sci* 3: 113-122.
- Kumaran A, Joel-Karunakaran R (2007)** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40: 344-352.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Boiwer PG, Bramley PM, Ridham JB (1995)** Lhe relative antioxydant activities of plant-derivec polyphenolic flavonoids, *Free Rad Res* 22: 375-383.
- Robards K, Antolovich M (1997)** Analytical chemistry of frit bioflavonoids: a review. *Analyst* 122: 11R-34R.
- Sarni-Manchado P, Cheynier V (2006)** Les polyphenols en agroalimentaire. Edition Science & Technology. Oxford, UK ; 529p.
- Singh N, Rajini PS (2004)** Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food. Chem* 85: 611-616.
- Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM (2007)** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng* 81: 200-208.
- Toor RK, Savage GP, Lister CE (2006)** Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *J Food Com Anal* 19: 1-10.
- Tsai TH, Chien YC, Lee CW, Tsai PJ (2008)** In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chem* 110: 859-864
- Turkmen N, Sari F, Velioglu YS (2006)** Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem* 99: 838-841.
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M (2002)** Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J Agric. Food Chem.* 50: 1619-1624.
- Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan Y, Fan W, Gu G (2006)** Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agric Food Chem* 54: 277-286.