

COMPARATIVE STUDY OF *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FOLIAR
ENDOPHYTIC FUNGI AND LEAVES EXTRACTS OF *PEGANUM HARMALA* OF
DAYATE AIAT (LAGHOUE, ALGERIA)

Y. Ouzid^{1,2}, N. Smail-Saadoun¹ et K. Houali*²

¹Laboratoire Ressources Naturelles, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie

²Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri,
Tizi-Ouzou, Algérie

Received: 04 May 2017 / Accepted: 28 October 2017 / Published online: 01 January 2018

Abstract

Endophytic fungi that reside in plant tissues are a potential source of secondary metabolites with biological activities. In our study, we investigated the detection of the antioxidant activity of the crude fungal extract of the genera *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium*: endophytic fungi isolated from the leaves of *Peganum harmala* harvested in Laghouat and extract of these same leaves. The extraction of these metabolites was carried out using ethyl acetate. The antioxidant activity of the latter was carried out by the DPPH test. Our tests reveal that the extracts studied have a low antioxidant activity. The inhibitory concentrations show a higher antioxidant effect for the *Penicillium* extract compared to the other extracts studied. The antioxidant molecules are related to the content of polyphenols. *Penicillium* extract has the highest polyphenol content. Our results confirm that endophytic

the same way as plants.

Key words: Leaf extract; Extracts of endophytic fungi; Antioxidant activity; Content of polyphenols and *Peganum harmala*.

Author Correspondence, e-mail: hualitizi@yahoo.fr

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v10i1.10>



1. INTRODUCTION

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules bioactives. Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées [1,2]. Cette recrudescence d'intérêt concerne les effets biologiques des antioxydants naturels inclus dans la lutte contre le stress oxydatif généré par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Celles-ci sont impliquées dans le vieillissement, le déclenchement et la progression de plusieurs maladies, telles que le cancer, l'athérosclérose, les accidents cardiovasculaires (AVC), l'ostéoporose, les maladies inflammatoires ainsi que les maladies neurodégénératives.

Ces plantes médicinales sont colonisées naturellement par des mycoendophytes, champignons mutualistes vivant dans les tissus de la plante et ne causant aucun symptôme de maladie apparent. Ils sont capables de fournir eux aussi des métabolites secondaires, ayant des activités biologiques. Les polyphénols dont les flavonoïdes, sont les principaux métabolites secondaires des plantes médicinales, ainsi que des champignons, responsables de leur activité antioxydante, antimutagène et antitumorale [3,4].

Peganum harmala est une plante vivace de la famille des Zygophyllaceae, connu sous le nom de Harmel. Elle est présente en abondance dans le Moyen-Orient et le Nord de l'Afrique [5]. *Peganum harmala* a été utilisée pendant longtemps en médecine traditionnelle pour le soulagement de la douleur et comme un agent antiseptique. Elle possède également des propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques, anti-virales, anti-oxydantes, anti-diabétiques, anti-tumorales, anti-leishmanioses, effet insecticide, une activité cytotoxique, ainsi que des effets hépato-protecteurs [6].

Notre présente étude vise à évaluer *in vitro* l'activité antioxydante, ainsi que la teneur en polyphénols des extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires préalablement isolés et identifiés, comparativement à l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Laghouat, Algérie).

2. MATERIELS ET METHODES

Zone d'échantillonnage

Au cœur du pays des dayas (Algérie), au sud de la wilaya de Laghouat, se localise notre zone d'étude, plus exactement dans la région de Timzerth. Dayate Aiat se localise à 50 Km du chef-lieu de la wilaya. Ces coordonnées GPS sont 33°31N pour la latitude, 2°56E pour la longitude. Elle se trouve à 871 m d'altitude. Sur le plan bioclimatique, la zone d'étude se situe dans l'étage aride, avec une saison sèche de 11 mois par an (Figure 1).



Fig.1. Situation géographique de la zone d'étude.

Matériel végétal

Les feuilles de *Peganum harmala* ont été fraîchement récoltées sur dix sujets sains au mois d'avril 2015. L'échantillonnage a été effectué de manière aléatoire. Les échantillons ont été placés dans des sachets en papier et conservés dans une glacière, puis au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation au laboratoire.

Fermentation et extraction des métabolites secondaires fongiques bruts

Les mycoendophytes utilisés dans notre étude ont été isolés à partir des feuilles saines de *Peganum harmala* et identifiés. Ces champignons sont purifiés et mis à croître sur PDA à température ambiante pendant sept jours. En se basant sur les caractères culturels et morphologiques, quatre genres fongiques à savoir : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été identifiés à partir des cultures de feuilles de *Peganum harmala*. Deux à

trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de PDB (Potato Dextrose Broth) [7]. Deux répétitions sont faites pour chaque champignon. L'incubation se fait à température ambiante pendant trois à quatre semaines, avec une agitation périodique à 150 tours/minute. Par la suite, le contenu est filtré à travers une gaze stérile, afin de séparer le mycélium du bouillon de culture [8,9]. Ce dernier est centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 min et le surnageant a été récupéré [10]. L'extraction a été faite à l'acétate d'éthyle, meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires fongiques selon [11, 12,13]. A chaque filtrat, il faut rajouter un volume égal de solvant et mettre sous agitation pendant 30 min à 40°C. La solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases. La phase organique a été récupérée pour être concentré sous pression par évaporation du solvant, à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C [9,14].

Préparation de l'extrait de feuilles

Les feuilles récoltées ont été séchées à l'ombre et à température ambiante. Elles sont réduites en une fine poudre. 1g de la poudre de feuilles a été additionné à 10 ml d'une solution aqueuse constituée d'acétate d'éthyle : Eau distillée (8:2 v/v), centrifugée à 4000 tours pendant 15 min pour recueillir le surnageant. Ce processus a été répété trois fois. Ensuite, le solvant a été éliminé par évaporation [15].

Activité antioxydante

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, nous avons utilisé le test de piégeage du radical libre DPPH (Diphénylpicrylhydrazyl) [16], qui est défini par l'indice d'inhibition de l'activité radicalaire en pourcentage, où le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) suivant la formule suivante :

$$I\% = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Où: Ac: absorbance du contrôle; At: absorbance du test.

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, nous avons considéré la concentration inhibitrice IC₅₀ de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est

d'autant plus élevée que son IC50 est faible. L'indice IC50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH de 50% [16]. Les valeurs de l'IC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

Dosage des polyphénols

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2007 par LI et ses collaborateurs [17]. 200 µl d'extrait fongique ou foliaire est mélangé avec 1 ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois dans de l'eau distillée. Après 4 minutes, 800 µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à concentration de 7,5 g/l sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 1 à 2 heures à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm. La quantité des polyphénols est déterminée par la courbe d'étalonnage, effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-0.3 mg/ml) dans les mêmes conditions. Dans l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, Y est le taux d'absorption lue à une longueur d'onde de 760 nm et X est la concentration des composés phénoliques en mg/ml (**Figure 2**).

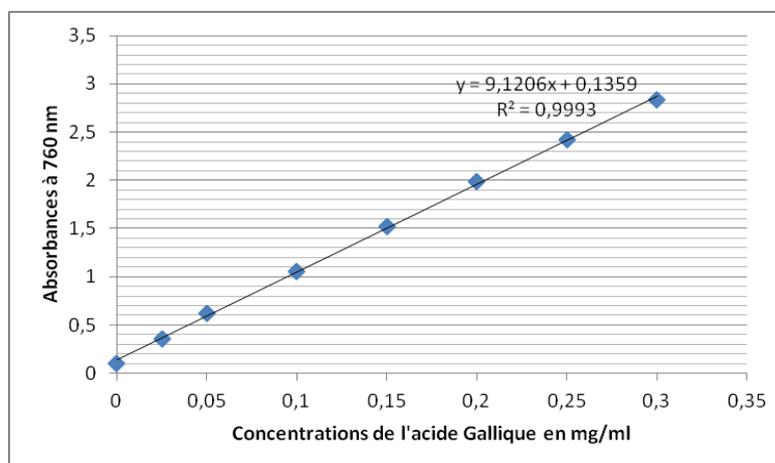


Fig.2. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la teneur totale en polyphénols des extraits fongiques et foliaire de *Peganum harmala*.

Analyse statistique

Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées, afin de mettre en évidence les différences significatives entre les IC50 obtenus, ainsi que les teneurs en polyphénols des différents extraits bruts fongiques et foliaire, à l'aide du logiciel Stat Box 6.40.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Nos essais antioxydants révèlent que les extraits de mycoendophytes foliaires et l'extrait de feuilles de *Peganum harmala* sont dotés d'un pouvoir antiradicalaire faible. *Peganum harmala* est une plante toxique, donc non consommée par les herbivores et encore moins par l'homme. Les IC50 montrent une activité antioxydante plus élevée dans l'extrait fongique de *Penicillium* (IC50=1.065±0.003mg/ml), suivie de celle de l'extrait d'*Aspergillus* (5.95±0.05mg/ml). Pour l'extrait d'*Alternaria*, elle est de 6.14±0.07mg/ml, de même que pour l'extrait foliaire avec une IC50 de 6.15±0.01mg/ml. Par ailleurs, l'extrait de *Cladosporium* montre une faible activité antioxydante avec une IC50 de 8.56±0.14mg/ml (**Tableau I**). Une différence hautement significative (p=0.00) est notée entre les IC50 des extraits fongiques et foliaire avec celle de l'acide ascorbique. Il en est de même pour les IC50 entre les différents extraits fongiques testés. La différence entre l'IC50 de l'extrait de *Cladosporium* et l'extrait foliaire est significative (p=0.01), mais l'analyse de variance faite entre l'IC50 des extraits d'*Alternaria* et d'*Aspergillus* et des feuilles ne révèle aucune différence significative (respectivement p=0.93 pour *Alternaria* et p=0.13 pour *Aspergillus*). Pour l'extrait de *Penicillium*, la différence est hautement significative (p=0.00). Le résultat obtenu pour l'IC50 du genre *Penicillium* est en accord avec les résultats retrouvés par JAKOVLJEVIC *et al.* (2014) où la valeur IC50 contre le radical DPPH était de 0.974 mg/ml pour *Penicillium fumiculosum* et 1,336 mg/ml pour *Penicillium chrysogenum* [18]. Les molécules antioxydantes extraites par l'acétate d'éthyle semblent être synthétisées beaucoup plus par *Penicillium* mycoendophyte foliaire que la feuille de *Peganum harmala* ou les autres champignons endophytes recensés à son niveau. Néanmoins, cette activité reste relativement faible par rapport à l'acide ascorbique, dont la valeur IC50 est de l'ordre de 0.127±0.002 mg/ml.

Tableau I : les IC 50 des différents extraits.

Différents extraits	Extrait <i>Cladosporium</i>	Extrait <i>Alternaria</i>	Extrait <i>Aspergillus</i>	Extrait <i>Penicillium</i>	Extrait foliaire	Acide Ascorbique
IC50±ES (mg/ml)	8.56±0.14	6.14±0.07	5.95±0.05	1.065±0.003	6.15±0.01	0.127±0.002

ES : Erreur standard.

Le type de solvant joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques et des molécules anti-oxydantes. Cependant, nos extraits des genres *Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium*, ainsi que l'extrait foliaire de *Peganum harmala* ont montré une activité antioxydante faible par rapport à l'extrait fongique du genre *Penicillium*, et cela peut être dû à la nature des molécules extraites avec l'acétate d'éthyle. C'est un solvant sélectif pour les composés phénoliques de bas poids moléculaires [19]. L'activité antioxydante des extraits de champignons endophytes et l'extrait foliaire peut être due à la présence des composés phénoliques dans ces derniers.

Les teneurs en polyphénols des différents extraits sont différentes. L'extrait de *Penicillium* présente cependant la teneur en polyphénols la plus importante : $4.143 \pm 0.007 \text{ mg/ml}$ (Figure 3). Les analyses de variance révèlent une différence hautement significative entre la teneur en polyphénols des extraits d'*Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* et celle de l'extrait foliaire ($p=0.00$). Il en est de même entre les différents extraits fongiques. La différence est juste significative entre la teneur en polyphénols de l'extrait *Cladosporium* et l'extrait foliaire ($p=0.01$).

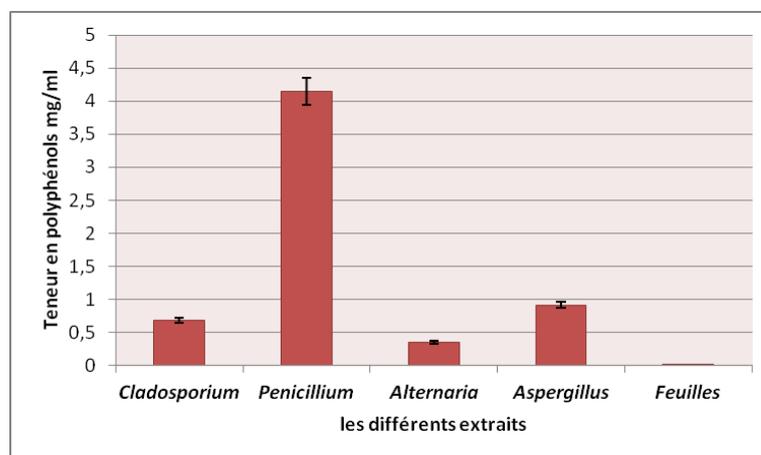


Fig.3. Teneur en polyphénols des extraits fongiques bruts et l'extrait foliaire.

Le champignon du genre *Penicillium* a montré une forte activité antioxydante par rapport aux autres champignons endophytes avec une teneur importante en polyphénols ($4.143 \pm 0.007 \text{ mg/ml}$). SADANANDA *et al.* (2011) ont montré que les champignons endophytes *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* de *Tabebuia sp.* possédaient des propriétés biologiques relatives aux mécanismes antioxydants [20]. Quant à FERNANDES *et al.* (2009), ils ont mis en évidence l'activité antioxydante chez *Alternaria alternata*, mycoendophyte du

Coffea arabica L. [21]. Pour RAVINDRAN *et al.* (2012), *Aspergillus flavus*, champignon endophyte dominant chez les espèces des mangroves, avait un potentiel antioxydant [22]. De même pour KHENNOUF *et al.* (2010), qui ont rapporté que les champignons endophytes *Phoma*, *Cladosporium* et *Chaetomium* avaient une activité antioxydante [23].

Nos résultats confirment que les mycoendophytes : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aspergillus* sont une source potentielle et limitée de composés naturels antioxydants au même titre que les plantes. Ces métabolites secondaires sont communs à la fois aux plantes et aux microorganismes. Ainsi, ces composés peuvent être produits par des entités associées sur le plan écologique [24]. L'activité antioxydante des extraits végétaux dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [25]. Par ailleurs, il est possible que divers métabolites végétaux pourraient être des produits du métabolisme de leurs endophytes [26].

4. CONCLUSION

L'étude des feuilles de *Peganum harmala* a mis en évidence une richesse au niveau des champignons endophytes qui la colonisent. Quatre genres au total ont été identifiés, il s'agit de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*. L'étude de l'activité antioxydante des extraits bruts des champignons endophytes et de l'extrait foliaire de *Peganum harmala* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que ces extraits possèdent une activité antioxydante faible. Cette activité est nettement inférieure à celle du référent, à savoir l'acide ascorbique. Néanmoins, le champignon endophyte *Penicillium* a montré la meilleure activité antioxydante, comparé aux autres mycoendophytes, mais aussi à la plante elle-même. Ces composés bioactifs sont issus d'un métabolisme associé entre les feuilles et leurs champignons endophytes. Le faible pouvoir antiradicalaire est dû à la toxicité de la plante expliquée par la synthèse d'alcaloïdes par cette dernière. L'activité antioxydante est généralement corrélée à une concentration de composés phénoliques. D'après la bibliographie, seul *Penicillium* est connu pour la synthèse de ces composés. Le métabolisme des champignons endophytes de *Peganum harmala* pourrait être influencé par les composés à rôle répulsif synthétisés par la plante seule, ou avec l'aide de ces mêmes champignons

symbiotiques présents dans les contrées arides dans lesquelles elle vit.

5. REFERENCES

- [1] Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19 (6-7):531-537.
- [2] Tadhani M.B, Patel V.H and Subhash R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 27(3): 323-329.
- [3] Heider E.M, Harper J.K, Grant D.M, Hoffman A, Dugan F, Tomer D.P and O'neill K.L. Exploring unusual antioxidant activity in a benzoic acid derivative: a proposed mechanism for citrinin, *Tetrahedron*, 2006, 62(6):1199-1208.
- [4] Yawadio Nsimba R, Kikuzaki H and Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds, *Food Chemical*, 2008, 106:760-766.
- [5] Chaieb M. et Boukhris M. (1998). Flore succinte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie. Tunis, Tunisia: Imprimerie d'or.
- [6] Jinous A and Fereshteh R. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala L.* *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 6(22):1573-1580.
- [7] Xiaoling C, Xiaoli L, Shining Z, Junping G, Shuiping W, Xiaoming L, Zhigang S. and YONGCHENG L. Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and The Natural Environment*, 2010, 2:017-024.
- [8] Barik B. P, Tayung K, Jagadev P. N and Dutta S. K. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences*, 2010, 2:8-16.
- [9] Mohanta J, Tayung K and Mohapatra U. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology*, 2007, 2(5):1-8.
- [10] Madki M. A, Manzoor A. S, Powar P. V and Patil K. S. Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 2 :848-858.

-
- [11] Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A and Sabaou N. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Medicale*, 2005, 4(15):211-219.
- [12] Gogoi D.K, Mazumder S, Saikia R and Bora T.C. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. *Journal of Medical Mycology*, 2008, 1(18):1-9.
- [13] Qin J.C, Zhang Y.M, Gao J.M, Bai M.S, Yang S.X, Laatsch H and Zhang A.L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 6(19):1572-1574.
- [14] Oliveira Silva M. R, Sena Xisto K and Buarque Gusumao N. Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In: Mendez-Vilas A.(eds). *Current Research Topics in Applied Microbiology: Proceedings of the II international Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, 2009, 4:519-520.
- [15] Darabpour E, Motamedi H and Seyyed Nejad S.M. Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2010, 3:124-127.
- [16] a) Sanchez-Moreno C, Larrauri J.A. and Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Technology International*, 1998, (8):121-137, b) Lanez T. et al. Antioxidant activity and superoxide anion radical interaction with 2-(ferrocenylmethylamino) benzonitrile and 3-(ferrocenylmethylamino) benzonitrile J. Iran. Chem. Soc., 2016, 13 (9), 1741-1748, c) Lanez T. et al. Spectrophotometrical study of antioxidant standards interacting with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Chemistry & Chemical Technology*, 2016, 10) (3), 255-258.
- [17] Li H.B, Cheng K.W, Wong C.C, Fan K.W, Chen F and Tian Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chimestry*, 2007, 102:771-776.
- [18] Jakovljević Violeta D, Milićević Jasmina M, Stojanović Jelica D, Solujić Slavica R. and

Vivić Miroslav M. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium fumiculosum*. Chemical Industry, 2014, 68(1):43-49.

[19] Premjanu N and Jaynthy C. Antioxydant Activity of endophytic Fungi isolated from *Lansea coromendalica*. International Journal of Research on Pharmaceutical Sciences, 2014, 5(4):304-308.

[20] Sadananda T, Nirupama S, Chaithra R, Govindappa K, M Chandrappa C.P and Vinay Raghavendra B. Antimicrobial and antioxydant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of Anticancer agent (Lapachol). Journal of Medicinal plants Research, 2011, 5(16):3643-3652.

[21] Fernandes M.R.V, Costa-Silva T.A, Pfenning L.H, Costa-Neto C.M, Heinrich T.A, Alencar S.M, Lima M.A and Ikegaki M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternate* isolated from *Coffea Arabica* L. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 2009, 45(4):677-685.

[22] Ravindran C, Naveenan T, Govindaswamy, Varatharajan R, Rajasabapathy and R.Meena R.M. Antioxydants in mangrove plants and endophytic fungal associations, *Botanica Marina*, 2012, 5(3):269-279.

[23] Khennouf S, Iratni N, Baghiani A, Harzallah D and Arrar L. Antioxydante and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso leaves and some phenolic compounds. Journal of Medicinal Plant Research, 2010, 4(13):1273-1280.

[24] Nicoletti R and Fiorentino A. Plant Bioactive Metabolites and Drugs Produced by Endophytic Fungi of Spermatophyta. *Agriculture*, 2015, 4(5):918-970.

[25] Burda S and Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Food chemistry*, 2011, 49(6):2774-2779.

[26] Kusari S, Hertweck C and Spiteller M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry and biology*, 2012, 19(7):792-798.

How to cite this article:

Ouzid Y, Smail Saadoun N and Houali K. Comparative study of in vitro antioxidant activity of foliar endophytic fungi and leaves extracts of *peganum harmala* of dayate Aiat (Laghouat, Algeria). *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2018, 10(1), 147-157.