

## EFFET ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS AQUEUX ET METHANOLIQUE DE *Satureja calamintha* ssp.(*Nepeta*) briq

BOUGANDOURA N, BENDIMERAD N

Laboratoire des Produits Naturels, Université Abou Bakr Belkaid, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie

**Résumé :** Les extraits naturels issus de végétaux pourraient contenir une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité antifongique des extraits éthanoliques et aqueux préparés à partir des feuilles de *Satureja calamintha*. L'estimation quantitative des flavonoïdes et des phénols totaux par la méthode colorimétrique a montré que les extraits de cette plante sont riches en ces composés. L'évaluation in vitro de l'activité antifongique des extraits sur trois souches fongiques (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *cladosporium herbarum*) montre que l'extrait méthanolique révèle une activité antifongique importante sur la souche fongique *A.flavus* qui se manifeste par une inhibition de l'ordre de 87,5%. Tandis que l'extrait aqueux s'est révélé sans effet inhibiteur sur la croissance des souches mycéliennes testées.

**Mots clés :** *Satureja calamintha*, dosage, flavonoïdes, pouvoir antifongique, polyphénols.

### ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AQUEOUS AND METHANOL EXTRACTS OF *Satureja calamintha* ssp. (*Nepeta*) briq

**Abstract:** Natural extracts resulting from plants contain a variety of biologically active molecules. In this context, we tried to evaluate the antifungal activity of aqueous and methanol extracts prepared from the leaves of *Satureja calamintha*. Quatitative estimation of total phenol and flavonoid content by a colorimetric assay showed that the aqueous and methanol extracts are rich in these components. Assessment in vitro antifungal activity of plant extracts against three fungal species (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*) show that the methanol extract had high moderate antifungal activity against *A. flavus* with 87,5% inhibition rate. However, the aqueous extract is revealed without any effects on the growth of all fungal species.

**Key words:** *Satureja calamintha*, phenolic components, flavonoids, fungal power, dosage.

### Introduction

Le genre *Satureja* appartenant à la famille des Lamiacées, comporte 200 espèces qui sont largement répandues dans les régions méditerranéennes, Sud-Ouest de l'Asie et l'Amérique [1]. La sarriette est une plante médicinale et condimentaire peuvent également être cultivées comme plantes ornementales. En effet, le terme « *Satureja* » vient du mot latin « *satura* » désignant pot à fleur (ornemental) [2]. Elle jouit d'une grande popularité en Algérie et au Maroc comme remède contre la toux, l'indigestion et les infections respiratoires bénignes. En effet, cette plante expectorante, stomachique et tonique,

possède des propriétés antiseptiques, antispasmodiques et carminatives [3, 4]. Les espèces de *Satureja* sont utilisées également comme désinfectants puissants et gents odoriférants dans les parfums [5].

Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'espèce *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. (Syn : *Calamintha nepeta*), qui pousse spontanément dans la région de Tlemcen, en particulier dans les montagnes jusqu'à 1500 mètres d'altitude [6]. L'espèce *Satureja calamintha* est une petite plante vivace qui ne dépasse pas 40 cm de haut au parfum mentholé. Les tiges sont molles et velues, et portent des feuilles opposées, à pétiole moyen,

légèrement dentées. Les fleurs, visibles de juillet à octobre, sont d'un joli rose ou pourpres [3].

Plusieurs travaux ont été réalisés sur le genre *Satureja* ayant révélé la présence d'huiles essentielles, de flavonoïdes, de tanins, d'acides phénols (acide rosmarinique, acide caféique) et de saponines [2]. Toutefois, peu de travaux en Algérie ont été consacrés à l'espèce *Satureja calamintha* et se limités à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et à notre connaissance, cette plante n'a fait l'objet d'aucune recherche relative à l'activité anti microbienne des extraits phénoliques.

Notre étude vise à caractériser les polyphénols de l'espèce *Satureja calamintha* et à évaluer *in vitro* l'effet antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur la croissance de trois souches mycéliennes.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1 Préparation du matériel végétal

La plante *Satureja calamintha*, spontanée, étudiée a été récoltée au mois d'octobre dans la région de Tlemcen. Les feuilles ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité et stockées soigneusement en vue de leurs analyses.

### 1.2 Préparation des extraits méthanoliques

Une prise d'essai de 2,5g de poudre des feuilles a été mise à macérer dans 25ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 30 minutes. L'extrait a ensuite été stocké à 4°C durant 24 heures, filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50°C au Rotavapor [7].

### 1.3 Préparation des extraits aqueux

Dix grammes de poudre des feuilles ont été portés à reflux pendant 2 heures dans 150 ml d'eau distillée, puis filtrés. Ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à 65°C au Rotavapor [8].

### 1.4 Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu [9].

Une quantité de 200µl de l'extrait est mélangé avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5%. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par g de matière végétale sèche.

### 1.5 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium [10]. Une quantité de 100µl de l'extrait a été mélangée avec 0,4ml d'eau distillée puis avec 0,03ml d'une solution de nitrite de sodium NaNO<sub>2</sub> à 5%. Après 5 minutes, 0,02ml d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> à 10% a été ajouté. Après 5 minutes on additionne au mélange 0,2ml de solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M et 0,25ml d'eau distillée. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de catéchine par g de matière végétale sèche.

## 1.6 Test antifongique

### 1.6.1 Les souches fongiques

Les souches fongiques ont été obtenues auprès du laboratoire des Produits Naturels de l'Université de Tlemcen. Les cultures pour chaque espèce fongique ont été maintenues dans le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) inclinées et conservées à la température de 4°C. Les moisissures utilisées dans cette étude sont: *Aspergillus flavus* MNHN 994294, *Fusarium oxysporum* MNHN 963917 et *Cladosporium herbarum* MNHN3369.

### 1.6.2 Méthodes de contact direct

La méthode de contact direct est utilisée en vue de déterminer les extraits actifs par l'évaluation du taux d'inhibition selon la méthode de Fandohan et al. [11]

Une quantité de 500 µl de l'extrait méthanolique (40 mg/ml) et de l'extrait aqueux (100mg/ml) de la plante est incorporée séparément dans des tubes contenant 20ml du milieu PDA maintenu en surfusion. Chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation manuelle puis son contenu est coulé dans une boîte de pétri. Un disque mycélien de 6mm de diamètre prélevé de la culture jeune du mycète a été inoculé. La lecture des résultats a été effectuée après 5 jours d'incubation à (25±2) °C par mesure du diamètre de la zone de croissance. Parallèlement, nous avons déterminé le diamètre de la zone de croissance de ces mêmes souches fongiques en absence d'extrait. L'effet antimicrobien des extraits sur la croissance des souches filamenteuses est déterminé par la mesure du taux d'inhibition de la croissance en utilisant la formule d'Ebbot [12] :

$$T = (D_k - D_0) / D_k \times 100$$

$D_k$  : Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm)

$D_0$  : Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm)

T : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage

Les résultats obtenus sont comparés à ceux de l'antifongique Nystatine (30µg/ml) testé sur les mêmes souches fongiques.

## 1.7 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés par la moyenne et l'écart type, les comparaisons statistiques ont été faites au moyen du test de Student et la valeur  $p < 0.05$  a été considérée significative.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1 Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes

La détermination des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les deux extraits de *Satureja calamintha* a été faite en utilisant séparément les méthodes colorimétriques au Folin-Ciocalteu et au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). La teneur en phénols totaux estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu pour chaque extrait a été rapportée en mg équivalent d'acide gallique/g de matériel végétal sec. Les résultats montrent que l'extrait aqueux a une forte teneur en phénols totaux (12,6±0,775mg/g) par rapport à celle de l'extrait méthanolique (2,968±0,809) (Tableau 1). La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium pour chaque extrait a été rapportée en mg équivalent de catéchine/g de matériel végétal sec. Les résultats révèlent que les deux extraits présentent des teneurs modérées (Tableau 1). En se basant sur ces données, on peut déduire

que les flavonoïdes représentent 43,24% des phénols totaux dans l'extrait méthanolique, tandis que le taux de

flavonoïdes dans l'extrait aqueux ne dépasse pas 24,84% des phénols totaux.

**Tableau 1:** Rendement (%), teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits de *S. calamintha*

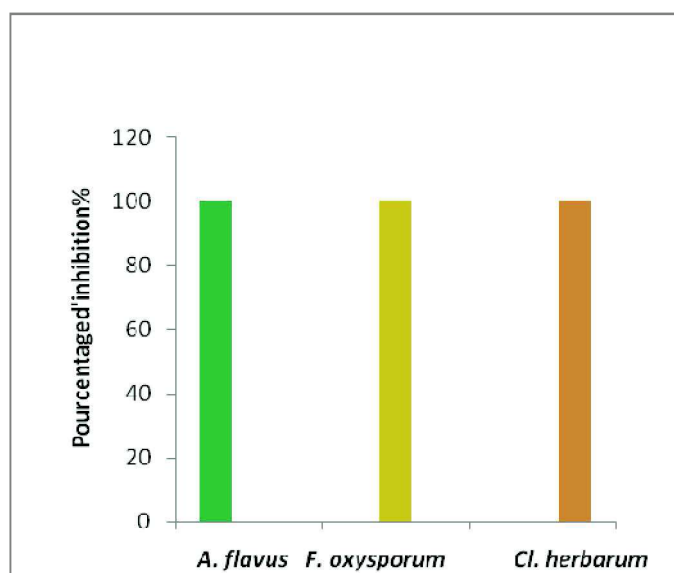
Extraits	Rendement (%)	Teneur en phenolstotaux	Teneur en flavonoides
Méthanolique	8,58%	2,968±0,809	1,280±0,077
Aqueux	22,19%	12,6±0,775	3,131±0,154

La moyenne ± écart type ; n=3

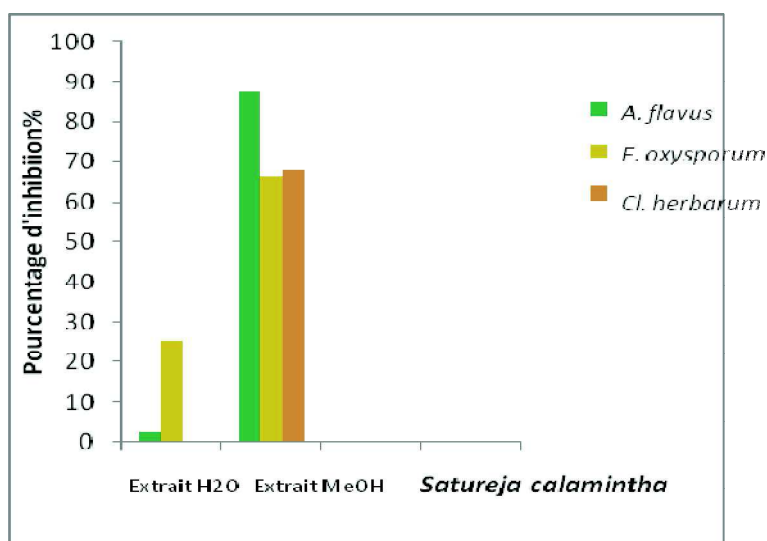
## 2.2 Pouvoir antifongique

Les résultats du pourcentage d'inhibition des extraits méthanoliques et aqueux de *S. calamintha* et de la nystatine, déterminés à partir des diamètres des zones d'inhibition (figure 1 et 2), montrent que l'extrait organique méthanolique exerce une activité inhibitrice sur toutes les souches mycéliennes testées avec un pourcentage

d'inhibition variant de 66,66% sur *F. oxysporum* à 87,5% sur *A. flavus*. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues avec l'extrait aqueux mais légèrement inférieures à celles de l'antifongique de référence à savoir la nystatine. En présence de l'extrait aqueux, aucune activité n'est par ailleurs notée sur les deux souches fongiques *A. flavus* et *Cl. Herbarum*).



**Figure1:** Pourcentage d'inhibition des extraits de *S. calamintha* relatif aux souches fongiques



**Figure 2:** Pourcentage d'inhibition de la nystatine relatif aux différentes souches fongiques.

Selon les résultats enregistrés, les extraits méthanoliques sont plus actifs que les extraits aqueux. Cette différence peut être à l'origine de la composition chimique différente entre les deux extraits, l'alcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires comme les flavonoïdes isolés de *Satureja parvifolia*[13].

Ces résultats peuvent également être expliqués par le taux élevé des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux dans l'extrait méthanolique (43,24%) par rapport à l'extrait aqueux (24, 84%).

Les composés phénoliques sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent, l'efficacité de ces substances évaluées *in vitro* ont montré une action inhibitrice sur les microorganismes [14]. De nombreuses études ont révélé la relation contradictoire entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir antimicrobien.

Chabot et *al.*[15]rapportentque les flavonoïdes qui sont caractérisés par l'absence du groupement hydroxyle sur le

noyau B présentent une activité antimicrobienne plus élevée que ceux ayant le groupe-OH. D'autre part, Moris et *al.* [16] ont montré que les flavonoïdes les plus substitués par le groupement hydroxyle libre sont impliqués dans l'activité antimicrobienne en particulier les molécules trihydroxylées en C3', C4', C5' sur le noyau B et hydroxylé en C3 (3-OH).

Pour cela nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires à effet antifongique tels que les stéroïdes, les saponosides et les huiles essentielles qui ont par ailleurs déjà été signalés par plusieurs auteurs [17, 18, 19].

Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne.

## Conclusion

Les extraits méthanoliques de *S. calamintha* se sont révélés actifs sur les trois souches fongiques testées. Ces extraits pourraient donc constituer une alternative pour résoudre le problème d'altération post-récolte liée aux moisissures et éviter la perte en qualité et en quantité des légumes et des fruits pendant l'entreposage. Cette activité reste néanmoins nettement inférieure à celle de la nystatine, mais il s'agit d'extraits bruts contenant un grand nombre de composés différents. Il est donc très probable qu'ils contiennent des composés qui, une fois purifiés, présentent une activité comparable à celle de la nystatine. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier ces constituants.

## Remerciements

Nous remercions profondément madame BEKHECHI Chahrazed, Maître de Conférences et chef d'équipe au Laboratoire des Produits Naturels, pour l'aide technique.

## Références bibliographiques

- [1]. Ayla K., Fatih S. and Fatih G. 2009- Nutlet surface micromorphology of Turkish Satureja (Lamiaceae). *Biologia*; 64 (5): pp. 902-907.
- [2]. Vârban D.I., Duda M., Vârban R. and Muntean S. 2009- Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. *Culture.Bulletin UASVM Agriculture*; 66(2): pp. 225- 229.
- [3]. Baba Aissa F. 2000 - *Encyclopedie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident*, Ed. Librairie moderne (Rouiba). 46p.
- [4]. Lamendin H. 2007 - *Soignez votre bouche par les plantes: remède d'hier et aujourd'hui*, 5<sup>ème</sup> Ed. L'Harmattan (Paris). 34p.
- [5]. Chiej R. 1984- *Macdonald encyclopedia of medicinal Plants*, Ed. Macdonald. (London). 212 p.
- [6]. Quezel P. et Santa S. 1969 - *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Tome II, Ed. du Centre National de la Recherche Scientifique (Paris). 788p.
- [7]. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdely C. 2008- Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*; 331: pp. 372-379.
- [8]. Majhenic L., Kerget M.S. and Knez Z. 2007- Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*; 104: pp.1258-1268.
- [9]. Singleton V.L. and Rossi J.A. 1965- Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*; 16: pp. 144-153.
- [10]. Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., Moon H.Y. and Lee C.Y. 2003- Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.*; 51(22) : pp. 6509-6515.
- [11]. Fandohan P., Gbenou J. and Gnonlofin B. 2004- Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn. *J. Agric. Food Chem.*; 52: pp. 6824-6829.
- [12]. Motiejūnaitė O. and Peičulytė D. 2004- Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air

quality. *Medicina Kaunas*, 40(8): pp. 787-794. *Journal of Ethnopharmacology*; 73: pp. 317-322.

[14]. **Cowan M. 1999-** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology review*; 12 (4): pp. 564-582.

[15]. **Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R. and Piché Y. 1992-** Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched condition. *New Phytol*; 122: pp. 461-467.

[16]. **Mori A., Nishino C., Enoki N. and Tawata S. 1987-** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*; 26: pp. 2231- 2234.

[13]. **Hernandez N.E., Tereschuk M.L. and Abdala L.R. 2000-** Antimicrobial activity of flavonoids in Medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina).

[17]. **Morris, J.A., Khettry, A. and Seitz, E.W. 1997-** Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*; 56: pp. 595-603.

[18]. **Yousef, R.T. and Tawil, G.G. 1980-** Antimicrobial activity of volatile oils. *Die Pharm.*; 35: pp. 698- 701.

[19]. **Bajpai, V.K., Rahman, A. and Kang, S.C. 2007-** Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Ind. Crop. Prod.*; 26: pp. 28- 35.