

REPUBLIQUE DU BENIN
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE BENINOIS DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION
Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes
www.dgb-uac.org – contact@dgb-uac.org – (+229) 21 13 92 31

FICHE TECHNIQUE N° 3

Détermination des principes actifs des huiles essentielles des feuilles des vitroplants et des plantes mères de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* cultivés au Bénin.

Dr. Ir. Coovi René DOSSOUKPEVI

Dr. Ir. Moussibaou DJABOUTOU

Dr. Codjo Clément GNIMADI

Dr. Gilles CACAÏ

Pr. Dr. Ir. Guy Apollinaire MENSAH

Pr. Dr. Ir. Corneille AHANHANZO

Dr. Yves Yao Soglo

SOMMAIRE

PREFACE

INTRODUCTION

MATERIEL VEGETAL

METHODOLOGIE

RESULTATS

IMPLICATION POUR LE DEVELOPPEMENT

CONCLUSION

REMERCIEMENTS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PREFACE

Les plantes de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum*, appartenant à la famille des *Lamiaceae*, poussent dans toutes les régions du Bénin et sont très largement utilisées par les populations locales, qui les mettent couramment en culture autour des habitations et dans les centres maraîchers puis les proposent sur les marchés locaux. Ces deux espèces ne sont pas disponibles sur toute l'année à cause de leur cycle végétatif d'une part et d'autre part en raison de la forte pression anthropique. Elles possèdent de nombreuses vertus sur le plan médical, culinaire et phytosanitaire (antiviral, antifongique, insecticide et bactéricide). Cette pression anthropique entraînerait plus tard l'extinction de leur biodiversité. Grâce aux travaux de thèse du Professeur YAYI Eléonore, Maître de Conférences des Universités, à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC), leur culture, leurs usages et surtout leurs huiles essentielles sont connues depuis les années 1990. Les méthodes traditionnelles de culture de ces deux espèces de *Ocimum* très prisées sur le plan culinaire et sur le plan phytothérapeutique ne permettent plus de satisfaire la demande de plus en plus croissante due à l'accroissement de la démographie. Il s'avère alors indispensable d'utiliser les méthodes classiques de la biotechnologie moderne végétale pour d'une part réaliser leur production à grande échelle et d'autre part améliorer leurs métabolites secondaires (huiles essentielles). Pour y parvenir, la culture *in vitro* constituerait l'une des voies à explorer. Ces deux espèces de *Ocimum* regorgent donc une forte potentialité économique pour une nation lorsqu'elles sont valorisées.

Prof. Dr Ir. Guy Apollinaire MENSAH

Directeur de Recherches au CAMES

Directeur du Centre de Promotion et de Transfert

des

Technologies de l'Université d'Abomey-Calavi

Institut National des Recherches Agricoles du

Bénin

Introduction

L'initiation d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* en culture *in vitro* a été étudiée. (Aïdam A. V., 2005). Ces espèces sont les plus cultivées au Bénin. Les résultats obtenus indiquent que la concentration de l'hypochlorite de sodium qui conviendrait le mieux serait de 10% pour l'espèce *O. basilicum* et *O. gratissimum* en culture *in vitro*, aussi bien pour les graines que pour les boutures. (Dossoukpèvi, 2008). Après la détermination de la dose optimale de l'hypochlorite de sodium à utiliser, il s'est agi ensuite de développer des stratégies de production à grande échelle de *O. basilicum* et de *O. gratissimum*. Ce qui fut fait et les résultats indiquent qu'il y a un fort taux de régénérescence et un bon développement des organes aériens des deux espèces étudiées sur le milieu de base MS modifié par la combinaison 1 mg/L d'ANA associé à 1mg/l de BAP. (Dossoukpevi et al., 2012).

Les deux espèces de *Ocimum* ont une importante source d'huiles essentielles.

Quelle serait l'incidence de la culture *in vitro* sur les constituants des huiles essentielles de ces deux espèces ?

L'objectif de la présente fiche technique est d'évaluer les principes actifs des vitroplants et des plantes mères des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum*.

MATERIEL VEGETAL



Plantes mères *Ocimum basilicum*



Plantes mères *Ocimum gratissimum*

Le matériel végétal est constitué de deux espèces de *Ocimum* à savoir : *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum*. L'authenticité botanique des échantillons étudiés a été effectuée à l'Herbier National du Bénin (HNB). Ces échantillons ont été identifiés sous les numéros AA6436/HNB pour *Ocimum basilicum* L. et AA6437/HNB pour *Ocimum gratissimum* L. Les explants qui sont des segments uninodaux des tiges des deux espèces ont été prélevés dans la serre du Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes (LCBVAP).

1. METHODOLOGIE

1.1 Procédé d'extraction des huiles essentielles des deux espèces de *Ocimum*

L'extraction des huiles essentielles (HEs) des plantes de *O. basilicum* (OB) et de *O. gratissimum* (OG) obtenues en serre et leurs vitroplants respectifs est réalisée par la méthode de l'hydrodistillation (Clévenger, 1928). Cette extraction concerne quatre (04) échantillons dont deux composés de plants naturels (témoins de OB et OG) et deux de vitroplants (OB et OG). Cette distillation à l'eau a permis d'extraire les essences contenues dans les feuilles fraîches après récolte, sous la pression de la vapeur d'eau. Le mélange vapeur d'eau et huile essentielle est condensé à l'aide d'un système réfrigérant puis collecté dans un essencier. L'huile est ensuite séparée de l'eau par décantation à l'aide d'une micropipette. Cette distillation a duré en moyenne 180 minutes. L'huile essentielle récupérée a été conservée au réfrigérateur à 4°C jusqu'à analyse.

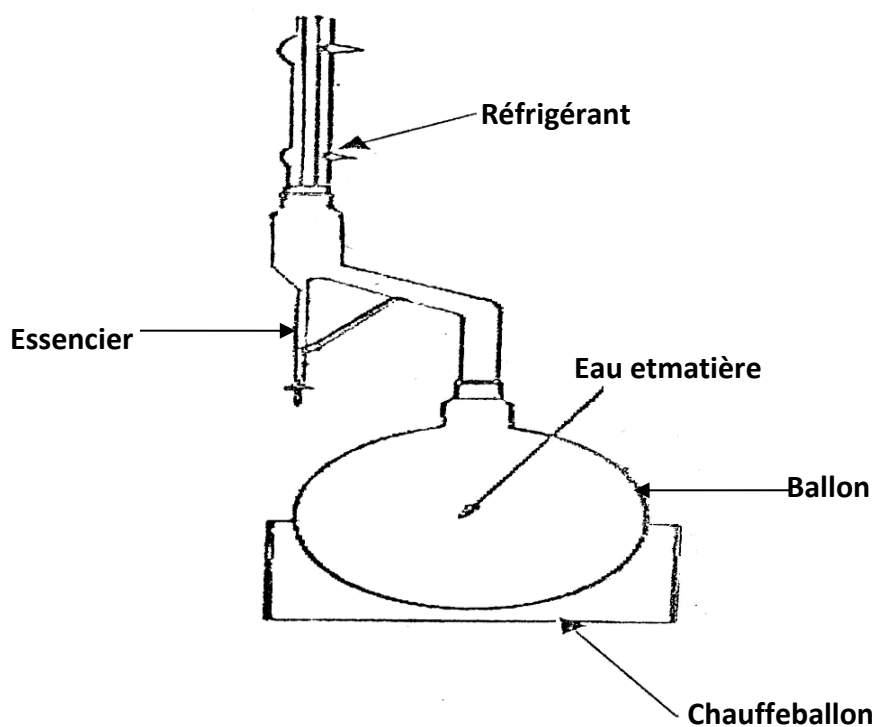


Figure 5: Schéma de l'appareil de distillation des huiles essentielles:hydrodistillation

Source : Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles à l'ISBA de Cotonou.

1.2 Détermination du rendement des huiles essentielles obtenues

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE} = \text{M}'/\text{M} \times 100$$

RHE: rendement en huile essentielle des feuilles de chaque espèce ;

M' : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme;

M : masse des feuilles de chaque espèce de *Ocimum* utilisée en gramme et qui vaut 100 g.

1.3 Analyse phytochimique des huiles essentielles extraites des deux espèces de *Ocimum*

L'identification des constituants de l'huile essentielle se fait par comparaison du spectre de masse de chaque pic séparé par Chromatographie Gazeuse CG avec ceux reportés comme

références dans des bibliothèques spécialisées de spectrométrie de masse. Le dosage des huiles essentielles des deux espèces de *Ocimum* étudiées a été réalisé par la méthode Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM). La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange.

Tableau 1 : Récapitulatif des Conditions opératoires des analyses par CG/SM

Colonne capillaire	HP5 MS	Stabilwax
Mode de détection	Impact Electronique	Impact Electronique
Courant d'ionisation	70 eV	70 Ev
Longueur	30m	60m
Diamètre interne	0,25mm	0,25mm
Epaisseur de phase	0,25µm	0,25µm
Température du détecteur (FID)	320°C	320°C
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
Débit	0,7 ml/min	0,3ml/min
Pression en tête de colonne	10-7 mbar	10-7 mbar
Pression (source, analyseur)	280°C	280°C
Température d'interface		
Température de l'injecteur	250°C	250°C
Programmation du four	2°C/min de 60°C à 280°C	2°C/min de 60°C à 280°C
	8 min à 60°C	8 min à 60°C
	15 min à 280°C	15 min à 280°C
Concentration des échantillons	Pur	Pur
Quantité injectée	1 µl	1 µl
Mode d'injection	Split 1 :20	Split 1 :20

2. RESULTATS



Figure 1 : Plant naturel et vitroplant de *O. basilicum*

Source : LCBVAP/DGB/FAST/UAC



Figure 1 : Plant naturel et vitroplant de *O. gratissimum*

Source : LCBVAP/DGB/FAST/UA

2.1 Rendement en huiles essentielles

Tableau 2 : Données sur l'extraction des huiles essentielles de *O. basilicum* et de *O. gratissimum*

PLANTE					Masse d'huile essentielle (g)	Rendement D'extraction (%)
FAMILLE	ESPECE	Nature Plante	Organe	Masse (g)		
LAMIA-CEAE	<i>Ocimum Basilicum</i>	Plante Mère	Feuille	425	4,71	1,11
		Vitroplant	Feuille	150	1,27	0,85
	<i>Ocimum Gratissimum</i>	Plante Mère	Feuille	650	6,93	1,07
		Vitroplant	Feuille	225	2,34	1,04

Les résultats du tableau montrent que les feuilles du témoin de *O. gratissimum* (1,07%) ont une teneur identique en huile essentielle que celles du vitroplant (1,04%). Pour *O. basilicum*, les feuilles du témoin (1,11%) ont une teneur légèrement élevée en huile essentielle que celles du vitroplant (0,85%).

Les huiles essentielles des feuilles fraîches de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* cultivés en serre constituent le témoin et celles des mêmes espèces produites en culture *in vitro* sont extradites (vitroplants).

Tableau 3 : Compositions chimiques des huiles essentielles des feuilles des plants naturels (témoin) et des vitroplants de *Ocimum basilicum*

Classes des HE	S/Classes des HE	Constituants	Témoin	Vitroplant
Monoterpènes - Témoin : 76,64% - Vitroplant : 94,74%	Hydrocarbonés - Témoin : 51,35% - Vitroplant : 69,35%	γ-terpinene	19,32%	19,32%
		Ortho cymene	2,52%	2,52%
		α-Terpinolene	3,73%	3,73%
		Terpinen-4-ol	25,78%	43,78%
	Oxygénés - Témoin : 25,29% - Vitroplant : 25,39%	Trans-sabinenehydrate	1,00%	1,10%
		Linalool	24,29%	24,29%
Sesquiterpènes - Témoin : 5,26% - Vitroplant : 5,26%	Hydrocarbonés - Témoin : 5,26% - Vitroplant : 5,26%	Caryophyllene	2,00%	2,00%
		Trans-α-bergamotene	3,26%	3,26%
	Oxygénés - Témoin : Néant - Vitroplant : Néant	Indéterminé	NEANT	NEANT

Tableau 4 : Compositions chimiques des huiles essentielles des feuilles des plants naturels (témoin) et des vitroplants de *Ocimum gratissimum*

Classes des HE	S/Classes des HE	Constituants	Témoin	Vitroplant	
Monoterpènes - Témoin : 90,60% - Vitroplant : 67,34%	Hydrocarbonés - Témoin : 60,97% - Vitroplant : 60,97%	γ-terpinene	5,54%	5,54%	
		β-cymene	52,00%	52,00%	
		p-Cymenene	3,43%	3,43%	
	Oxygénés - Témoin : 29,63% - Vitroplant : 6,37%		trans-sabinene hydrate	2,40%	0,40%
			4-Terpinenyl acetate	0,51%	0,51%
			Methyl thymol ether	0,90%	0,90%
			L-4-terpineol	1,16%	1,16%
			Thujene-2-one	0,44%	0,44%
			Z-Citral (neral)	0,75%	0,75%
			Citral	0,58%	0,58%
			Carvacrol	22,89%	1,63%
	Sesquiterpènes - Témoin : 9,41% - Vitroplant : 8,90%	Hydrocarbonés - Témoin : 8,90% - Vitroplant : 8,90%	(Iso-β)-caryophyllene	3,52%	3,52%
			α-Caryophyllene	0,44%	0,44%
β-Selinene			3,82%	3,82%	
α-Selinene			1,12%	1,12%	
Oxygénés - Témoin : 0,51% - Vitroplant : 0%			Caryophyllene oxyde	0,51%	Indéterminé

Tableau 5 : Composés majoritaires des huiles essentielles de *O. basilicum* (Témoin et vitroplant)

Constituants	Pourcentage (%)	
	Témoin	Vitroplant
Terpinen-4-ol	25,78	43,78
Linalool	24,29	24,29
γ-terpinene	19,32	19,32
α-Terpinolene	3,73	3,73
trans-α-bergamotene	3,26	3,26
TOTAL (%)	76,38	94,38

Tableau 6 : Composés majoritaires des huiles essentielles de *O. gratissimum* (Témoin et vitroplant)

Constituants	Pourcentage (%)	
	Témoin	Vitroplant
β-cymene	52,00	52,00
Carvacrol	22,89	1,63
γ-terpinene	5,54	5,54
β-Selinene	3,82	3,82
(Iso-β-)caryophyllene	3,52	3,52
TOTAL (%)	87,77	66,51

2.2 Principaux composés majoritaires identifiés

Les principaux composés majoritaires identifiés sont :

- pour *Ocimum basilicum*, le Terpinen-4-ol, le Linalool et le γ -terpinene représentant entre 70 et 88 % des huiles essentielles totales. Les autres constituants importants sont le α -Terpinolene (environ 4 %) et le trans- α -bergamotene (environ 3,50 %) ;
- pour *Ocimum gratissimum*, le β -cymene et le Carvacrol représentant entre 54 et 75 % des huiles essentielles totales. Les autres constituants importants sont le γ -terpinene (environ 6 %), le β -Selinene (environ 4 %) et le (Iso) caryophyllene (environ 4 %).
- Les résultats ci-dessus révèlent très peu de variation au niveau des composés entre plantes mères et vitroplants de la même espèce.

- Les huiles essentielles de *O. gratissimum* sont en majorité monoterpéniques (90,60 %), avec une prépondérance des composés hydrocarbonés (67,71 %) dominés par le β -cymène (52,00 %).
- Les huiles essentielles de *O. basilicum* sont également de type monoterpénique (93,74%), avec une proportion de monoterpènes hydrocarbonés (69,45 %) largement supérieure à celle des monoterpènes oxygénés (24,29 %). (Dossoukpevi et al., 2016).

Les résultats révèlent très peu de variation au niveau des composés entre plantes mères (témoin) et vitroplants de la même espèce. S'agissant de *O. basilicum*, les taux des composés sont constants sauf le taux de Terpinen-4-ol (43,78) du vitroplant qui est largement supérieur à celui (25,78) de la plante mère. Quant au *O. gratissimum*, les taux des composés sont aussi constants sauf le taux de carvacrol (22,89) de la plante mère qui est plus élevé que chez celui (1,63) du vitroplant.

3. IMPLICATION POUR LE DEVELOPPEMENT

Les huiles essentielles des feuilles de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* ont quant à elles révélé des activités antibactériennes [Adebolu et al., 2005 ; Shafique et al., 2011] qui pourraient être utiles en médecine vétérinaire. Grâce à leurs huiles essentielles, *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* sont utilisées par les populations pour les soins primaires. Elles sont utilisées comme insecticide pour se protéger des piqûres de moustique d'une part, et d'autre part semblent efficaces à tous les stades de développement contre des ravageurs.

Les composés possédant la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols: le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Il y a aussi les alcools monoterpéniques tels que : le géraniol, le linalool, le thujanol, le myrcénol et le terpinéol. Les propriétés antioxydantes sont notamment attribuées, à la présence dans la composition de ces huiles essentielles des phénols des monoterpènes oxygénés (linalool; 1,8-cinéole; néral) et quelques monoterpènes hydrocarbonés (γ -terpinène; α -terpinène et α -Terpinolène). Les deux espèces de *Ocimum* étudiées comportent des composés chimiques leur conférant des activités antibactériennes et antioxydantes. Les vitroplants de ces deux espèces sont donc à diffuser aux fins de permettre aux populations de satisfaire leurs besoins vitaux.

CONCLUSION

Les variations observées au niveau de la composition chimique de chacune de ces deux huiles pourraient être liées à l'écologie, à la période au cours de laquelle les plantes ont été récoltées dans l'année. Les proportions de composés majoritaires et minoritaires sont plus ou moins respectées aussi bien chez les vitroplants que chez les plantes mères en dépit de quelques rares variations qui à coup sûr serait soit liée à la différence de nutrition entre vitroplants et plants naturels (témoin). Les stress ressentis par les organes cultivés *in vitro* participent à l'exsudation d'un bon nombre de métabolites secondaires qui naturellement ne sont pas présents ou sont présents mais en de très faibles concentrations.

REMERCIEMENTS

- Il m'est tout d'abord agréable de remercier mon directeur de thèse, le Professeur Corneille AHANHANZO, Professeur Titulaire des Universités (CAMES). Il m'a accueilli à cœur ouvert dans son laboratoire et accepté diriger ce travail de recherche de main de maître. J'ai ainsi eu la chance de bénéficier de son soutien sans faille et de ses encouragements pendant les durs moments de doute et de découragements. Merci infiniment pour sa disponibilité, son écoute, son soutien moral et sa patience dont il a fait preuve à mon égard lors des travaux de recherche de ma thèse malgré ses multiples activités scientifiques et ses lourdes responsabilités. Par ses conseils et sa rigueur scientifique, il m'a inspiré confiance le souci de toujours bien faire. Je salue en lui son efficacité et lui exprime ma plus vive reconnaissance.
- J'exprime ma profonde reconnaissance au Professeur Guy Apollinaire MENSAH, Directeur de Recherche (CAMES), pour sa présence et sa participation à l'élaboration de mes fiches techniques me touche particulièrement. Il n'a épargné aucun effort pour m'aider à soulever toutes les difficultés rencontrées lors de la rédaction de ces fiches. Ses remarques et ses précieux conseils donnés, avec une extrême amabilité, ont été très utiles pour mener à bien le présent travail. Je le prie de trouver ici le gage de ma gratitude et j'espère pouvoir continuer à bénéficier dans l'avenir de sa haute compétence.
- Docteur Clément GNIMADI, Chargé de Recherche (CAMES) pour ces moments passés ensemble au Laboratoire d'Economie Locale et de Développement Participatif (EleDP) et la réalisation un peu commune des activités de recherche. Il fut fort

agréable de parcourir ce bout du chemin avec toi, et ainsi de devenir amis. Merci de tes coups de mains dans l'élaboration de mes fiches techniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adebolu et al, 2005 :Adebolu T. T., and OladimejiSalauAbiola, 2005. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimumgratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (7), pp. 682-684

AFNOR, 1986 : Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57p.

Clevenger J. P. ,1928. Apparatus for volatile oil determination, description of new type.

American Perfumer and Essential Oil Review, 23: 467– 503.

Dossoukpevi R. ,2008: Mémoire de DEA sur l'étude du comportement de deux espèces de *Ocimum*spp.(*Lamiaceae*) en culture *in vitro* et comparaison de la qualité de l'ADN de leurs vitroplants à celle des plantes mères.

Dossoukpevi R.; C. Ahanhanzo; H. Adoukonou-Sagbadja ; G. Cacaï; H. Naïtchéde et C. Agbangla. 2012 : Contribution à l'amélioration de la production *in vitro* de deux espèces de *Ocimum*spp (*Lamiaceae*): *Ocimum basilicum* et *Ocimumgratissimum* cultivées au Bénin. Int. J. Biol. Chem. Sci. 6(6): 4046-4057.

Dossoukpevi* R., Ahanhanzo C., Gbaguidi F., Agbangla C., Agbidinokoun A., Cacaï G..2016. Incidence des plantes régénérées *in vitro* sur les huiles essentielles de deux espèces de *Ocimum* cultivées au Bénin. Journal of Applied Biosciences. Invoice N°: 03/2016/JAB/1158. Vol. 99: 9441- 9451, 31 Mars 2016.

Shafique M., Khan S.J., Khan N.H.; Pharmacologyonline ; (2011) 1; 105-111.