



Incidence des plantes régénérées *in vitro* sur les huiles essentielles de deux espèces de *Ocimum* cultivées au Bénin

René DOSSOUKPEVI^{1,2}, Corneille AHANHANZO^{1,2}, Fernand GBAGUIDI³, Clément AGBANGLA², Arnaud AGBIDINOUCOUN², Gilles CACAÏ².

¹ Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. 03BP1665 Cotonou (Bénin) ;

² Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi. 01BP526 Cotonou (Bénin) ;

³ Laboratoire de TP Chimie Pharmaceutique et Chimie Organique de l'Unité de Formation et de Recherche en Pharmacie de la Faculté des Sciences de la Santé. 01BP188 Cotonou (Bénin). Correspondance : dossoukpevi_rene@yahoo.fr

Original submitted in on 3rd February 2016. Published online at www.m.elewa.org on 31st March 2016
<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v99i1.10>

RESUME

Objectif : Les *Ocimum* sont des plantes médicinales d'importance capitale due à leur composition en huiles essentielles. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact de la culture *in vitro* sur la production des huiles essentielles de deux espèces de *Ocimum* cultivées au Bénin.

Méthodologie et résultats : 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). L'extraction des huiles essentielles des quatre lots de feuilles a été réalisée par hydrodistillation. L'analyse des huiles essentielles des deux espèces de *Ocimum* étudiées a été réalisée par la méthode Chromatographie Gazeuse à la Spectrométrie de Masse GC/MS avec le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG-MS). On détecte la présence de nombreux monoterpènes qui constituent la quasi-totalité des composés majoritaires de *O. basilicum* et *O. gratissimum*. 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.

Conclusion et applications. 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). Aux stress ressentis par les organes cultivés *in vitro* est participant 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.

Mots clés : Culture *in vitro* ; *Ocimum basilicum* ; *Ocimum gratissimum* ; huiles essentielles ; composition chimique ; chromatographie.

Impact on the essential oils of *in vitro* regenerated plants of two species of *Ocimum* grown in Benin.

ABSTRACT

Objective: *Ocimum* are important medicinal plants due to their composition in essential oils. The objective of this study was to evaluate the impact of *in vitro* culture of the two species of *Ocimum* cultivated in Benin for essential oils production.

Methods and results: The essential oils from fresh leaves of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* grown in agreehouse were the control and those of the same species produced by *in vitro* culture were plantlets. Extraction of essential oils from four sheets of batches was performed by steam distillation. Analysis of the essential oils of both species of *Ocimum* studied was done by coupling of Gas Chromatography by Mass Spectrometry GC / MS method with the coupling of the gas chromatography to mass spectrometry (GC-MS). the presence of many monoterpenes was detected which are almost all of the major compounds of *O. basilicum* and *O. gratissimum*. The results show very little variation in compounds between mother plants (control) and *in vitro* plants of the same species. Regarding *O. basilicum*, compounds rates are constant except Terpinen-4-ol rate (43.78) of vitroplant which is significantly higher than that (25.78) from the parent plant. As for *O. gratissimum*, compounds rates are also constant except carvacrol rate (22,89) from the parent plant that is higher than that (1.63) of vitroplant.

Conclusion and applications: The rates of principal and the minor compounds were found in both plantlets and natural plants despite some rare variations that were based on the difference in nutrition between the tissue culture plants and natural plants. The stress experienced by organs grown *in vitro* is involved in the exudation of a number of secondary metabolites which naturally are not present or are present but in very low concentrations

Keywords : *in vitro* culture; *Ocimum basilicum*; *Ocimum gratissimum*; essential oils; chemical composition; chromatography.

INTRODUCTION

Le genre *Ocimum* de la famille des *Lamiaceae* regroupe au moins 60 espèces et plusieurs variétés à travers le monde (Srivastava, 1982 ; Mondello et al., 2002). Il représente une importante source d'huile essentielle utilisée en industrie alimentaire, parfumerie cosmétique et pesticides (Pascual-Villalobos et Ballesta-Acosta, 2003 ; Koba et al., 2009). *Ocimum* sp. sont également utilisés en médecine traditionnelle pour différentes applications dans beaucoup de pays africains et asiatiques (Yusuf et al. , 1994). Dans la famille des lamiacées, le genre *Ocimum* représente un groupe de plantes caractérisées en particulier par la production des huiles essentielles. Ces huiles essentielles ont une valeur commerciale et thérapeutique très importante. Il n'est plus permis aujourd'hui d'ignorer les apports considérables de la médecine traditionnelle dans la couverture sanitaire des collectivités rurales dont le pouvoir d'achat est très faible (Diakitè , 1998). Environ 80% de la population

africaine utilise, la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de santé (OMS, 2002). L'espèce *O. basilicum* L. appelée 'basilic' en français, 'basil' en anglais, 'kesu kesu' et 'Hissi hissi' en fon et 'akohun' en goun, fait l'objet de plusieurs usages à savoir : infusion comme thé, usages culinaires, usage médical contre céphalées, hypotrophie frontale, dystocies, drépanocytose (Akoègninou et al. 2006). Selon ces auteurs, l'espèce *O. gratissimum* L., appelée 'gros basilic, plante moustique, buisson thé, feuille fièvre' en français, 'tchiayo, tchan madiwè tchamadilo, xébioso' en fon et goun possède aussi plusieurs vertus : macéré aqueux contre les dystocies, douleurs pelviennes, dysménorrhées, coliques, candidoses digestives, vomissement et la diarrhée. Les feuilles de *Ocimum gratissimum* sont utilisées dans le traitement des diarrhées et des infections du tractus respiratoire (Onajobi et *Ethnopharmacol*, 1986). En Afrique Subsaharienne, *Ocimum basilicum* et

Ocimum gratissimum sont cultivés et employés pour l'aromatisation des mets (Yayi, 1994). Les feuilles séchées et pulvérisées sont un succédané du poivre (Aïdam., 2005). Le basilic accompagne à merveille pâtes, salade, œufs et tomates (Paulette Vanier, Josiane Cyr, Dt. P., 2006). Ces dernières années, les huiles essentielles font partie des voies les plus explorées dans la régulation des ravageurs. Leur application dans la protection des stocks a fait l'objet de nombreux travaux. *Ocimum gratissimum* et *Ocimum basilicum* sont les espèces médicinales les plus cultivées au Bénin (Franchomme, 1990). Aussi, certaines espèces existant à l'état endémique subissent une forte pression du fait des récoltes intensives et sont menacées de disparition. Aujourd'hui, le pouvoir germinatif des semences de *Ocimum* devient très faible et pour les deux espèces, l'hétérogénéité des descendances, liées à la culture de ces espèces ne permettent pas d'assurer une bonne productivité et une amélioration de leur rendement en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles. Ainsi, l'amélioration de la germination des graines et les techniques de biotechnologies végétales ont été développées pour produire les vitroplants de *Ocimum* en culture *in vitro* (Ahanhanzo et al., 2003 ; Aïdam A. V., 2005 et

Dossoukpevi et al., 2012). La culture *in vitro* permet donc de contourner les difficultés et de disposer très rapidement en masse du matériel végétal de plantation de bonne qualité sanitaire et de même génotype pour les exploitations industrielles (Firoozabady et al, 2003 et Teixeira et al., 2001). Il s'avère nécessaire de mettre en œuvre des stratégies d'une part pour sauvegarder et surtout pour optimiser la production et d'autre part pour améliorer le rendement en métabolites secondaires de ces deux espèces très appréciées de *Ocimum* au Bénin. Dans le cadre de la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la stabilité de la composition en HE des vitroplants de *O. basilicum* et *O. gratissimum*. Ainsi, le présent travail a pour objectif général d'évaluer la composition chimique des huiles essentielles des vitroplants et des plants naturels (témoins) de *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* cultivés au Bénin (figures 1 et 2). Pour ce faire, il s'agira d'une part de déterminer les rendements des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* et d'autre part de comparer la composition chimique des huiles essentielles des vitroplants et les plants naturels (témoins) des deux espèces de *Ocimum*.



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



Figure 2 : Plant naturel et vitroplants de *O.gratissimum*

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal : Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles fraîches de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* cultivés d'une part dans la serre et d'autre part des vitroplants produits au Laboratoire Central des Biotechnologies et d'Amélioration des Plantes de l'Université d'Abomey-calavi (6°26'56,20"N). Cette localité bénéficie d'un climat subéquatorial caractérisé par une longue saison des pluies d'avril à juillet et une courte saison des pluies d'octobre à novembre. Le matériel végétal a été identifié à l'aide de l'herbier national de l'Université d'Abomey Calavi. *Ocimum basilicum* a été identifié sous le n° AA 6372/HNB et *Ocimum gratissimum* sous le n° AA 6373/HNB.

Méthodes

Préparation du matériel végétal : Les plantes mères ont été obtenues à partir des graines ensemencées dans des pots en polyéthylène remplis de terreau et disposés dans la serre du Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) à l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Les pots ont été traités avec du carbodan en granulés trois jours avant semis, et les microorganismes du sol à la dose de 4 g par pot. Les plantules ont été traitées avec du PACHA combiné à un fongicide (Topsin-M) un mois au moins après semis, les insectes à la dose de 2 ml d'insecticide et 4 g de fongicide par litre d'eau. Le terreau a été arrosé de manière à maintenir une humidité suffisante pour la germination des graines. Les

plantules issues de la germination ont été entretenues dans la serre jusqu'au prélèvement des explants (fragments de tiges).

Obtention des vitroplants : Les prélèvements des explants pour l'établissement des cultures *in vitro* ont été effectués 45 jours après semis pour *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum*. La méthode utilisée pour le prétraitement des explants est celle décrite par Malaurie et al. (1995), Doukouré (2000), Ahanhanzo et al. (2003) et Aidam (2005). Les fragments de tiges prélevés ont été débarrassés de leurs feuilles, rincés à l'eau distillée stérile puis immergés dans l'alcool éthylique à 70° pendant cinq minutes. Ensuite, ils ont été trempés dans des solutions d'hypochlorite de sodium (10%) contenant quelques gouttes de Tween 20 pendant quinze minutes. Ils ont ensuite été rincés trois fois à l'eau distillée stérile. Après l'élimination d'eau par dépôt des explants sur du papier buvard stérile, les explants, morcelés à nœud unique d'environ 1,5 cm de longueur, ont été aseptiquement déposés sur le milieu de base MS (solution minérale de Murashige et Skoog, 1962). Les tubes, contenant chacun un explant ont été fermés par un couvercle en plastique et scellés avec du film transparent. Toutes ces opérations se sont déroulées sous une hotte à flux laminaire horizontale de marque FASTER. Ces tubes ont été entreposés dans une salle de culture (vitrothèque) à une température moyenne 27 °C ± 1 °C avec une intensité lumineuse de 6000 lux. L'humidité

relative est de 80% et la photopériode est de 12 heures de lumière par jour.

Procédé d'extraction des huiles essentielles des deux espèces de *Ocimum* : L'extraction des huiles essentielles (HEs) des plantes de *O. basilicum* et *O. gratissimum* obtenues en serre et leurs vitroplants respectifs est réalisée par la méthode de l'hydrodistillation (Clévenger, 1928). Elle concerne quatre (04) échantillons dont deux composés de plants naturels (témoins de OB et OG) et deux de vitroplants (OB et OG). Elle a été réalisée au Laboratoire d'enzymologie et de Biochimie à l'ISBA au Champ de Foire de Cotonou. La récolte des quatre lots de feuilles (deux lots de plants naturels issus de la serre et deux lots de vitroplants issus de la salle de culture) a été effectuée vers 8 heures du matin au Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et d'Amélioration des Plantes (LCBVAP) du Département de Génétique et des Biotechnologies (DGB) à l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). L'extraction des huiles essentielles des quatre lots de feuilles a été réalisée au Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie des Protéines à l'Institut des Sciences Bio-Médicales Appliquées (ISBA). 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 et vu la petite quantité de vitroplant qu'on avait, on a ajouté de Xylène pour mieux récupérer les huiles essentielles. L'huile essentielle récupérée a été conservée au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à analyse.

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. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG-MS) est une technique d'analyse utilisée pour le dosage des huiles essentielles extraites des deux espèces de *Ocimum*. Le chromatogramme en phase gazeuse permet de séparer les constituants d'un mélange. Le spectromètre de masse associé permet d'obtenir le spectre de masse de chacun des constituants et bien souvent de les identifier. Le principe de l'analyse GC/MS est le suivant :

- L'analyse GC/MS (IE) ont été réalisées sur un TRACE GC 2000 séries (Thermo Quest, Rodano, Italy), équipé d'un autosampler AS2000 (Thermo Quest). Le système GC est couplé à un spectromètre de masse de type Trace MS (Thermo Quest) opérant en mode d'impact électronique.

- Le GC/MS est équipé d'une colonne capillaire CP-WAX52CB (Chrompack) de dimensions 25 m x 0.25 mm avec 0.2 µm de diamètre interne. Les échantillons sont injectés en mode splitless (volume injecté : 1 µl, température à l'entrée : 230 °C).

- La température du four est programmée de la façon suivante :

Amps	Rate (°C/min)	Temp (°C)	Hold time (min)
Initial	/	65	5
Ramp 1	2.0	185	0
Ramp 2	3.0	230	10

- L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1.3 ml/min. La température de couplage du GC est de 260 °C. L'énergie des électrons est de 70 eV et la source des électrons est à 250 °C. Les données sont enregistrées et analysées avec le logiciel Xcalibur 1.1 (Thermo Quest). Les spectres de masse des pics obtenus sont analysés et comparés aux composés de référence et à la bibliothèque NIST/EPA/NIH 98.

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

Colonne capillaire	HP5 MS	Stabilwax
Mode de détection	Impact Électronique	Impact Électronique
Courant d'ionisation	70 eV	70 Ev
Longueur	30m	60m
Diamètre interne	0,25mm	0,25mm
Épaisseur 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	1µL	1µL
Mode d'injection	Split 1 :20	Split 1 :20

RESULTATS

Rendement en huiles essentielles :

Tableau2 : Données sur l'extraction des huiles essentielles de *O. basilicum* et *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

Le tableau ci-dessus indique que quatre (04) lots de feuilles dont deux (02) pour *O. basilicum* (plantes mères et vitroplants) et deux pour *O. gratissimum* (plantes mères et vitroplants) ont fait objet d'extraction d'huiles essentielles. La masse de feuilles prélevées a varié d'un lot à un autre à cause de leur disponibilité. Les résultats du tableau 2 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%).

Composition chimique des huiles essentielles : Les analyses effectuées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM) ont montré des compositions chimiques différentes selon les huiles essentielles extraites de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum*.

Tableau3 : 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 : 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

L'huile essentielle du témoin de *O. basilicum* (tableau 3) est également de type monoterpénique (93,74%), avec une proportion de monoterpènes hydrocarbonés (69,45%) largement supérieure à celle des monoterpènes oxygénés (24,29%). Les principaux constituants sont : le terpinen-4-ol (25,78% pour le témoin et 43,78% pour le vitroplant) pour la fraction hydrocarbonée et le linalol (24,29%) pour la fraction oxygénée (tableau 4). Les sesquiterpènes sont minoritaires (5,26%) dans ces échantillons de *O. gratissimum* car aucun composé de ce groupe n'a été identifié à un taux supérieur à 3,50%. A

l'instar des huiles essentielles de *O. gratissimum*, l'huile essentielle du vitroplant de *O. basilicum* est identique en nombre et en taux des composés du témoin sauf la culture *in vitro* a impacté positivement le taux de terpinen-4-ol. Les principaux composés majoritaires identifiés sont le Terpinen-4-ol, le Linalool et le γ-terpinene représentant entre 70 et 88 % des huiles essentielles totales (tableau 4). Les autres constituants importants sont le α-Terpinolene (environ 4 %) et le trans-α-bergamotene (environ 3,50 %) (Tableau 4).

Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles des plants naturels (témoin) et de 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 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

Extraites par hydrodistillation et analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la

Spectrométrie de Masse (CPG/SM), les résultats qui en sont issus indiquent que :

(1) L'huile essentielle du témoin de *O. gratissimum* (tableau 5) est en majorité monoterpéniques (90,60 %),

avec une prépondérance des composés hydrocarbonés (67,71%) dominés par le β -cymène (52,00%) (Tableau 6). Dans le groupe des monoterpènes oxygénés (29,63%), le carvacrol, composé majoritaire représente 22,89% (tableau 6). Les sesquiterpènes sont minoritaires (9,41%) dans cet échantillon de *O. gratissimum* car aucun composé de ce groupe n'a été identifié à un taux supérieur à 4 %. L'huile essentielle du vitroplant de *O. gratissimum* est identique en nombre et en taux des composés du témoin sauf au niveau du carvacrol. Le taux de ce dernier a diminué très sensiblement 1,63% contre 22,89% pour le témoin. (2) Pour *Ocimum gratissimum*, le β -cymène et le Carvacrol représentant entre 54 et 75 % des huiles essentielles totales (tableaux 5 et 6). Les autres constituants importants sont le γ -terpinène (environ 6 %), le β -Selinène (environ 4 %) et le (Iso) caryophyllène (environ 4 %). On détecte la présence de nombreux monoterpènes qui constituent la quasi-totalité des composés majoritaires de *O.basilicum* et *O.*

DISCUSSION

Les résultats du tableau 2 montrent que les feuilles du témoin de *O. gratissimum* (1,07%) ont une teneur semblable 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%). L'analyse chimique des huiles essentielles des feuilles aussi bien du témoin que du vitroplant de *O. gratissimum* obtenues dans nos travaux révèle que les β -cymène (52,00%), Carvacrol (22,89%) et γ -terpinène (5,54%), en sont les constituants majeurs. L'essence volatile des feuilles aussi bien du témoin que du vitroplant de *O. basilicum* obtenue dans nos résultats contient le terpinen-4-ol comme composé majoritaire suivi du Linalool. Les Terpinen-4-ol (25,78 et 43,78), Linalool (24,29) et γ -terpinène (19,32) sont les trois principaux composés des huiles essentielles des feuilles vertes de *O. basilicum* aussi bien chez les plants naturels que chez les vitroplants. Contrairement aux analyses CPG-MS de notre étude, Sajjadi (2006) a identifié les principaux constituants de l'huile essentielle extraite des feuilles vertes de *Ocimum basilicum* récoltées à Isfahan à savoir le méthyl chavicol (40,5 %), le géraniol (27,6 %), le néral (18,5 %) et l'oxyde de caryophyllène (5,4 %) Parmi les trois composés majoritaires obtenus avec les huiles de *Ocimum basilicum* dans le cadre de notre étude, seul le linalol a été observé dans *Ocimum basilicum* variété pourpre en Iran (Sajjadi (2006). Les trois composés de *Ocimum basilicum* majoritaires dans la présente étude sont mentionnés dans les études réalisées par Yayi (1998),

gratissimum. Les résultats des tableaux ci-dessus révèlent très peu de variation au niveau des composés entre plants naturels (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. Les terpènes les plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée telles que les mono (C10) et les sesquiterpènes (C15). Pour conclure, il est à retenir globalement qu'il n'y a pas une amélioration quantitative des huiles essentielles chez les plantes issues de la culture *in vitro* sauf le composé Terpinen-4-ol chez *O. basilicum*.

mais seul le linalol présente une valeur comparable à celle trouvée dans le cadre du présent travail. Des travaux similaires ont été réalisés au Togo à partir des feuilles de *Ocimum basilicum* et ont permis d'obtenir 85,50 % d'estragol, 2,25 % de 1,8-cineole, 1,71 % de linalol, 1,63 % de E- α -bergamotène (Yayi,1998). Les valeurs de la composition chimique des trois composés majoritaires dans notre étude sont largement différentes de celles rapportées par Koba et al. (2009) au Togo. Au Mali, les compositions chimiques des composés majoritaires de cette même plante ont donné aussi des valeurs nettement différentes des nôtres : linalol (57 %), eugénol (19,2 %), α -cadinol (3,2 %), trans- α -bergamotène (2,7 %) (Bassolé et al., 2010). L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG/SM) a révélé que ces essences volatiles sont en majorité monoterpéniques avec une prédominance de monoterpènes hydrocarbonés chez *O. basilicum* (69,45%). Force est de constater que l'échantillon de *O. basilicum* issu de la culture *in vitro* (vitroplant) que nous avons étudié appartient au chémotype à terpinen-4-ol car sa valeur (43,78%) étant plus élevée que celle (25,78%) du témoin.. Pour l'échantillon témoin, terpinen-4-ol et linalool sont aussi deux composés majoritaires avec des valeurs similaires pour linalool (24,29%). Dans les huiles essentielles du témoin de *Ocimum gratissimum*, le β -Cymène (52%), le Carvacrol (22,89%) et le γ -terpinène (5,54%) sont majoritaires. Par contre, celles des vitroplants ne

contiennent que des traces de Carvacrol (1,63%). On pourrait dire que β -Cymene (52%) est le seul composé majoritaire. D'autres travaux de recherche sur les huiles essentielles de cette plante ont révélé différentes proportions de composés chimiques à travers le monde. Au Cameroun, une étude indique le thymol (47,7 %) et le β -terpinène (14,3 %) comme composés majoritaires (Tatsadjieu, 2008). Sahouo Bedi et al.(2003) ont également mis en évidence la prédominance du thymol (70,8 %) dans l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* de la Côte d'Ivoire. Dans ce même pays, une étude conduite par Oussou et al. (2010) a permis d'obtenir dans l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*, le thymol

(34,6 %), le p-cimène (25,2 %), α -sélénène (6,8 %), le myrcène (5,4 %), le (E)- β -caryophyllène (4,9 %) et α -thujène (4,5 %). Comme chémotype au Brésil, Cavalcanti et al. (2004) ont isolé dans l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* de l'eugénol (43,7 %), du 1-8 cinéole (32,7 %), du (Z)-Ocimène (6,2 %), et du trans-caryophyllène (4,1 %) ; alors qu'au Nigéria, Saliu et al. (2011) ont mis en évidence l'eugénol (61,9 %) et le cis-ocimène (8,2 %) pour cette même plante. Ces résultats montrent que la composition chimique des essences volatiles peut varier suivant les origines géographiques des plantes (Tchoumboungang, 1997).

CONCLUSION

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). D'une part et surtout aux stress ressentis par les organes cultivés *in vitro*, lesquels stress 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahanhanzo C, Agbangla C, Toukourou F, Dansi A, Daïnou O. 2003. Microbouturage et conservation *in vitro* des ressources génétiques d'ignames cultivées au Bénin. Annales des Sciences Agronomiques du Bénin, 6(1): 89-102.
- Aïdam A. V., 2005 : Établissement de cultures organisées de *Ocimum gratissimum* L. et de *Ocimum basilicum* L. en vue de la production de composés d'intérêts thérapeutiques et phytosanitaires. Thèse de doctorat en Physiologie et Biotechnologie Végétales. Université de Lomé 158 pages.
- Akoègninou A., Van der Burg W. J., Van der Maesen I. J. G., 2006 : Flore Analytique du Bénin. pp : 600-602
- Bassolé I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., Nebié R.C. Dicko M.H.; 2010. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination; Molecules; 15; 7825-7839.
- Cavalcanti E.S.B., de Morais S.M., Lima M.A.A, Santana E.W.P.; 2004. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.; Mem Inst Oswaldo Cruz.;(99; 541-544.
- Clevenger, J. P. (1928). Apparatus for volatile oil determination, description of new type. American Perfumer and Essential Oil Review, 23 : 467–503.
- Diakite C., 1998 : Le rôle de la pharmacopée et de la médecine traditionnelle dans le système de santé publique. 10. pp.100-104.
- Dossoukpevi R.; C. Ahanhanzo; H. Adoukonou-Sagbadja ; G. Cacal; H. Naïtchédé et C. Agbangla. 2012 : Contribution à l'amélioration de la production *in vitro* de deux espèces de *Ocimum spp* (Lamiaceae): *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* cultivées au Bénin. Int. J. Biol. Chem. Sci. 6(6): 4046-4057. .
- Doukoure S., 2000. Amélioration de la production de l'igname, par bouturage *in vitro*, chez les cultivars *Florida* et *Brazo fuerte* de *D. alata* L. Thèse de Doctorat Ingénieur. Université de Cocody, Côte d'Ivoire, 123p.
- Firoozabady E, Gutterson N (2003). Cost effective *in vitro* propagation methods for pineapple. Plant Cell Rep. 21: 844-850.
- Franchomme P. & Penoel D. (1990). Matière médicale aromatique fondamentale. Et L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Livre quatrième. Ed. R.Jollois. Limoges, 317-406.
- Koba K, Poutouli PW, Raynaud C, Chaumont J-P, Sanda K. 2009. Chemical composition and antimicrobial properties of different basil

- essential oils chemotypes from Togo. Bangladesh J. Pharmacol., 4: 1-8.
- Malaurie B., Pungu O., Trouslot M.F., 1995. Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *Dioscorea cayenensis*- *D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. Plant cell, Tissue and organ culture 41: 229- 235.
- Mondello L, Zappia G, Cotroneo A, Bonaccorsi I, Chowdhury JU, Yusuf M, Dugo J. 2002. Composition of some *Ocimum* oils *O. basilicum* L. var. *purpurascens*; *O. sanctum* L. green; *O. sanctum* L. purple; *O. americanum* L., citral type; *O. americanum* L., camphor type. Flavour Fragr. J., 17 : 335–340.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15 (3): 473-497.
- Onajobi F.D. J Ethnopharmacol 1986. Smooth muscle contracting lipid soluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*; 18; 311.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Anonyme), 2002 : Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002-2005 : edit OMS, Genève 69p
- Oussou K. R., Yolou S. F., Tue Bi B., Kanko C., Boti J. B., Ahibo C., J. Casanova. 2010. Étude Chimique Bio-Guidée de l'huile Essentielle de *Ocimum Gratissimum* (*Lamiaceae*) Eur. J. Sci. Res. ; 40 ; 50-59.
- Pascual-Villalobos MJ, Ballesta-Acosta MC. 2003. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on
- Paulette Vanier, Josiane Cyr, Dt. P., nutritionniste, 2006 : Le basilic au fil du temps, Usages culinaires, Conservation, Jardinage biologique, Écologie et environnement.
- Sahouo G.B., Tonzibo Z.F., Boti B., Chopard C., Mahy J.P., N'guessan Y.T.; 2003. Anti-Inflammatory and analgesic activities: chemical constituents of essential oils of *ocimum gratissimum*, *eucalyptus citriodora* and *cymbopogon giganteus* inhibited lipoxygenase l-1 and cyclooxygenase of pghs; Bull. Chem. Soc. Ethiop.; 17; 191-197.
- Sajjadi S. E. 2006. Analysis of the essential oils of two cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. DARU, 14; 128-130.
- Saliu B.K.1, Usman L.A., Sani, A., Muhammad N.O., Akolade J.O; 2011. Chemical composition and anti bacterial (oral isolates) activity of leaf essential oil of *ocimum gratissimum* l. grown in north central Nigeria. Int. J. Current Res.; 33; 022-028.
- Srivastava AK. 1982. Farm. Bull.(16),CIMAP:Lucknow, India.
- Tatsadjieu N.L, Etoa. F.-X., Mbofung C.M.F., Ngassoum M.B. 2008. Effect of *Plectranthus glandulosus* and *Ocimum gratissimum* Essential Oils on Growth of *Aspergillus flavus* and *Aflatoxin B1* Production. Tropicultura; 26; 78-83.
- Tchoumboungang F, 1997. Contribution à la détermination des teneurs, des caractéristiques chimiques et des activités antifongiques des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques, condimentaires et médicinales du Cameroun. Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle en Biochimie. Université de Yaoundé I. 270pp.
- Teixeira, V.L., Cavalcanti, D.N., Pereira, R.C., 2001. Biochem. Syst. Ecol. 29, 313.
- Yayi E, 1994 : Contribution à l'étude des huiles essentielles de trois espèces du genre *Ocimum*: *O. basilicum*, *O. gratissimum* et *O. canum*. Mémoire de DEA, FAST, UNB: 30p
- Yayi E. 1998, Contribution à l'étude des huiles essentielles de plantes aromatiques du Bénin : cas de l'*Ocimum basilicum*, *Ocimum canum* et *Ocimum gratissimum* dans la perspective de leur production. Thèse de doctorat en chimie organique des substances naturelles, Université Nationale du Bénin; 182p.
- Yusuf M, Chowdhury JU, Wahab MA, Begum J. 1994. Medicinal Plants of Bangladesh. BCSIR: Dhaka, Bangladesh.