



Variation diurne de la composition chimique et influence sur les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims cultivé au Bénin

Eléonore YAYI-LADEKAN^{1,2,3}, Dossou Sika Salomé KPOVIESSI^{1,2,4*},
Fernand GBAGUIDI^{1,2}, Bénédicte Gbelonu Hunmya KPADONOU-KPOVIESSI^{1,2},
Joachim GBENOU¹, Claude JOLIVALT³, Mansourou MOUDACHIROU¹,
Georges Coffi ACCROMBESSI² et Joëlle QUETIN-LECLERCQ⁴

¹Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE), Faculté des Sciences de la Santé (FSS), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 188 Cotonou, Bénin.

²Laboratoire de Chimie Organique Physique et de Synthèse (LaCOPS), Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abomey-Calavi (UAC), BP 4521 Cotonou, Bénin.

³Laboratoire Charles Friedel UMR 7223, Ecole Normale Supérieure de Paris-Chimietech, Paris 5^{ème}, Rue Pierre et Marie Curie, France.

⁴Laboratoire de Pharmacognosie, Groupe de recherche Pharmacognosie de l'Université Catholique de Louvain, UCL 7230 Av. Mounier, 72 B1200 Bruxelles, Belgique.

*Auteur correspondant, E-mail: kpovsalome@yahoo.fr, Tel : (00 229) 97 88 39 27

RESUME

L'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims (*Lamiaceae*) obtenue par hydrodiffusion à différents moments de la journée a été analysée par GC/FID et GC/SM puis testée sur différentes bactéries par la microtechnique de dilution. Le rendement et la composition chimique de l'huile varient selon le temps et l'ensoleillement. Abondant le matin à 7 heures (1,71±0,01%), le rendement décroît progressivement avec l'augmentation des rayons solaires, jusqu'à son minimum à 13 heures (1,35±0,01%) quand le soleil est au zénith, avant de croître à nouveau à sa valeur la plus élevée (1,78±0,02% à 19 h) au couché du soleil. Plus de 54 composés représentant près de 98% des hydrodiffusats, ont été identifiés dans les différents échantillons. Les principaux sont : α -thujène (5,56 à 7,85%), β -myrcène (2 à 6,94%), δ -3-carène (3,07 à 4,84%), *p*-cymène (14,61 à 22,8%), γ -terpinène (6,05 à 10,7%), carvacrol (7,94 à 30,8%), β -caryophyllène (0,15 à 18,86%) et β -sélinène (2,74 à 14,41%). Les taux de certains constituants comme β -caryophyllène et β -sélinène croissent avec l'ensoleillement contrairement à ceux du carvacrol, *p*-cymène. Cette variation diurne perturbe la synergie d'action des constituants de l'huile qui présentent une forte activité inhibitrice (0,38 à 7,19 mg/ml) sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19609 et *Staphylococcus aureus* résistante 1199B NorA. Les huiles obtenues à 7 heures et 19 heures sont les plus efficaces à faible concentration (0,38 à 2,88 mg/ml). Pour la première fois, l'interaction est démontrée entre variation diurne de la composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims du Bénin.

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Ocimum americanum*, composés volatils, Chémotype à carvacrol Variation diurne-Activité antibactérienne.

INTRODUCTION

Ocimum canum Sims encore appelée *Ocimum americanum* est une herbacée annuelle, aromatique et endémique de

l'Afrique subsaharienne. Elle appartient à la famille des *Lamiaceae* et se multiplie uniquement par les graines. C'est une espèce adventive très parfumée qui se développe sur

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v5i4.13>

les sols argilolimoneux humides comme les alluvions en bordure de cours d'eau, les vertisols de plaines inondables et les planosols. Sa germination est de courte durée et sa croissance est rapide (Hutchinson and Dalziel, 1963; Berhaut, 1967, 1975; Paton, 1992).

Elle est utilisée comme épices, condiments, arômes dans les boissons sucrées, sous forme de boissons théiformes contre les indigestions et la toux, dans le traitement des infections respiratoires, des gastro-entérites, de l'hépatite, du paludisme, de la syphilis et de la blennorrhagie et préconisée en cas d'insomnie et d'anxiété (Monjoin, 1981; Morton, 1981; Adjanooun et al., 1989; Janssen, 1989; Pousset, 1989; Anton and Lobstein, 2005; Kaou, 2008). Certaines de ces propriétés biologiques ont fait l'objet d'investigations scientifiques. Il s'agit des propriétés antimicrobiennes (Janssen, 1989; Baba-Moussa, 1997; Oussou et al., 2004), répulsives et larvicides de *Ocimum canum* Sims (Lukwa, 1994).

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles a permis de décrire plusieurs chémotypes de la plante dont les plus importants sont: linalol (88%) au Rwanda (Ntezurubanza et al., 1985), eugénol (67%) au Nigeria (Ekundayo et al., 1989), α -terpinéol/camphre (63,1%) au Mali (Chalchat et al., 1995), camphre (60%) en Guinée (Nianga et al., 1995), 1,8-cinéole (60,1%) au Burkina Faso (Bassole et al., 2001a, 2005b; Stewart et al., 2008) et trans-méthylcinnamate (79,7%) à Sao Tomé (Martins, 1999). Une variété de chémotypes en fonction du lieu de récolte a été décrite au Togo (Sanda et al., 1998) : un type à terpine-4-ol (24,0 à 34,8%)/ γ -terpinène (10,1 à 13,2%), un type à linalol (29,4 à 60,6%)/(E)- α -bergamotène (11,3 à 13,6%)/ β -caryophyllène (8,9 à 11,6%) et un type à terpine-4-ol (14,5 à 32,2%)/bicyclogermacrène (8,7 à 12,2%) (E)- α -bergamotène (9,2 à 21,4%), et dans l'île de la Grande Comore (Hassane et al., 2011) : un type à 1,8-cinéole (48,88%)/camphre (14,98%) et 1,8-cinéole (34,22%)/camphre (13,69%)/propanoate d'isopropyle (9,13%).

Les travaux antérieurs (Yayi et al., 2001) ont fait aussi état d'une grande variation en fonction du stade végétatif, du lieu et du moment de récolte, dans la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante au Bénin. Deux chémotypes ont été identifiés : un type à linalol et un à terpinolène-4-ol. Face à ces variétés de chémotypes à l'intérieur du même pays, les propriétés biologiques méritent d'être suivies en fonction de ces paramètres de variation de l'huile essentielle.

D'après nos investigations, l'influence de la variation de composition chimique en fonction de la période de récolte dans la journée sur les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims du Bénin n'a pas fait l'objet d'études scientifiques. De plus l'activité de l'huile essentielle de la plante reste à être élucidée sur plusieurs germes pathogènes résistants naturellement aux antibiotiques, contaminant les denrées alimentaires, rencontrés surtout en milieux hospitaliers et responsables de nombreuses infections.

Afin de sensibiliser la population sur l'évolution des propriétés de *Ocimum canum* Sims au cours de la journée et de mieux valoriser la plante, le présent travail s'est donné comme but d'étudier l'impact de la variation diurne de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims du Bénin sur ses propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de deux souches bactériennes résistantes et de quatre souches isolées des milieux hospitaliers. Il s'inscrit dans la perspective de la valorisation des huiles essentielles du Bénin en vue de leur efficace utilisation en agroalimentaire, en médecine et en cosmétique.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Les feuilles de *Ocimum canum* Sims ont été collectées en août 2009 à Abomey-Calavi au Sud du Bénin, où la température minimale de 21 °C peut atteindre un maximum de 31 °C à 13 heures. Elles ont été prélevées à 7 heures, 10 heures, 13 heures, 16

heures et 19 heures sur des plantes en pleine floraison. L'identification des espèces végétales a été faite à l'Herbier National du Bénin. Les feuilles ont été séchées pendant trois jours à l'abri des rayons solaires. Trois prélèvements ont été effectués par période de récolte et toutes les récoltes ont eu lieu sur le même site.

Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodiffusion à l'aide d'un appareil type Clevenger amélioré (Clevenger, 1928; Bruneton, 1993). Chaque extraction a duré trois heures. Après séchage sur du sulfate de sodium anhydre, chaque échantillon d'huile est conservé au congélateur à -30 °C.

Analyses chimiques

L'analyse des huiles essentielles a été effectuée avec le GC/FID et le couplage GC/SM (AFNOR, 2000).

Analyse GC/FID.

L'analyse est réalisée sur un FOCUS GC équipé d'une colonne capillaire CP Wax 52 CB (J&W Scientific Column de Agilent Technologies, N° US1670726A, USA) de dimensions 15 m x 0.25 mm avec 0.25 µm de diamètre interne. Les échantillons sont injectés en mode splitless (volume injecté : 1 µl, température à l'entrée: 260 °C, débit du split: 10 ml/min, temps du splitless: 0.80 min). La température du four est programmée de la façon suivante: température initiale 50 °C ; température finale : 250 °C; gradient de température : 6 °C/min ; palier isotherme à 250 °C pendant 5 min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1.2 ml/min. La température du détecteur FID est de 260°C. Les données sont enregistrées et traitées avec le logiciel Chrom Card. La quantification est achevée par le calcul des surfaces sous courbe des pics (GC/FID, par le procédé de normalisation) et l'identification des composés par comparaison des indices de rétention avec la référence.

Analyse GC/SM

Dans le but de confirmer la spécificité et la sélectivité de la méthode GC, des

analyses GC/SM_(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. La même colonne capillaire (CP Wax 52 CB) est utilisée avec les mêmes conditions d'injection, de débit de l'hélium et de programmation de la température du four. 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 260 °C. Les données sont enregistrées et analysées avec le logiciel Xcalibur 1.1 (Thermo Quest). Les spectres de masse des pics dans les huiles essentielles sont analysés et comparés aux composés de référence et à la librairie NIST/EPA/NIH (Heneberg et al., 1994; National, 1994).

Identification des composés.

Les constituants des différentes huiles essentielles sont identifiés par comparaison de leurs données spectrales et leurs indices de rétention chromatographique avec ceux des composés de référence et à des bibliothèques (Masada, 1976; Sadler, 1986; Sandra and Bicchi, 1987; McLafferty and Stauffer, 1993; Adam, 1995).

Tests antimicrobiens

Souches bactériennes et culture

Pour les tests *in vitro*, cinq souches sensibles fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC), dont trois de type gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Acinetobacter baumannii* ATCC 19609) et deux de type gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) et une souche résistante (*Staphylococcus aureus* 1199B NorA) ont été utilisées. Elles sont entretenues par repiquage sur gélose (MH) (BioRad référence 64884) à l'obscurité à 30 °C pour les bactéries gram négatif et à 37 °C pour les bactéries gram positif, avec dépôt de disque d'antibiotiques dans le cas des souches résistantes.

Criblage primaire

Les huiles essentielles sont criblées à une concentration de 11 mg/mL. Le criblage est réalisé dans des plaques de 96 puits contenant 12 colonnes (1 à 12) et 8 rangées (A à H) avec le robot Biomek 2000 de Beckman Coulter (Villepinte, France) permettant d'automatiser des opérations de transfert de liquides, de façon rapide, précise et reproductible. Le robot est couplé à un lecteur de plaques qui permet de mesurer l'absorbance des 96 puits d'une plaque de microtitration. Le volume final dans chaque puits est de 200 µl. Les inocula bactériens sont préparés à l'aide d'une culture de 18 heures diluée au 1/100^{ème} dans du milieu Müller Hinton (MH) stérile. Chaque test est effectué trois fois. Dans la dernière colonne de la plaque de 96 puits sont réalisés différents témoins : blanc, témoin de croissance, témoin de croissance en présence de 1% de DMSO, témoins permissifs de croissance avec antibiotiques (en présence de kanamycine à 0,5 µg/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et en présence d'ampicilline à 0,5 µg/ml pour *Escherichia coli* ATCC 25922). Un témoin d'inhibition de croissance est réalisé en présence de kanamycine à 32 µg/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et en présence d'ampicilline à 32 µg/ml pour *Escherichia coli* ATCC 25922. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C et la croissance bactérienne est suivie grâce à une série de mesures d'absorbance à 620 nm réparties sur 24 heures (h) (soit T_n avec n=1h, 4h, 7h et 24h). Les courbes de croissance en présence des substances testées ainsi obtenues sont comparées avec le témoin de croissance en présence de 1% de DMSO, afin de déterminer s'il y a une inhibition significative de la croissance ou non. A l'issue de chaque test, les substances sont classées en trois catégories : les substances actives (10) inhibent totalement la croissance bactérienne, les peu actives (100) ont une inhibition de croissance supérieure ou égale à 90% de celle du témoin en présence de DMSO et les inactives (1000) ont une inhibition de la

croissance inférieure à 90% de celle du témoin DMSO.

L'activité antibactérienne d'une huile ayant un score 1000 n'est pas intéressante. Par contre une huile essentielle de score 10 a un potentiel qui sera évalué plus précisément par la détermination de sa concentration minimale inhibitrice (CMI).

Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI

Pour les huiles essentielles les plus actives (score 10 ou 100 au criblage), les CMI sont déterminées en milieu liquide (gamme de concentration de 0,011 à 11,5 mg/ml) dans un volume final de 200 µl, par la méthode utilisant des plaques de microtitration à 96 puits (Carson et al., 1995; NCCLS, 2003). Un volume de 100 µl de solution mère d'antibiotique de concentration appropriée est dilué de 2 en 2 dans 100 µl de milieu MH. On ajoute ensuite 100 µl d'inoculum bactérien à 10⁶ UFC/ml (dilution au 1/100^{ème} d'une culture de 18 heures). Après 18 heures d'incubation de l'inoculum bactérien à 37 °C, on mesure l'absorbance à 620 nm et on repère à partir de la concentration d'antibiotique qui n'a pas donné de croissance bactérienne. La détermination de la CMI est réalisée trois fois pour chaque échantillon d'huile essentielle.

Analyse statistique

Toutes les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type de trois mesures. La limite de confiance a été fixée à P<0,05. Les écarts-types ne dépassent pas 5% pour la majorité des valeurs obtenues.

RESULTATS

Rendement en huiles essentielles

Les rendements moyens en huiles essentielles sont compris entre 1,35 et 1,78% (Tableau 1). Abondant le matin à 7 heures (1,71 ± 0,01%), le taux d'huile essentielle dans la plante décroît progressivement avec l'augmentation des rayons solaires, jusqu'à atteindre son minimum à 13 heures (1,35±0,01%), quand le soleil est au zénith. Ce taux croît ensuite avec la disparition des rayons solaires pour atteindre sa valeur la plus

élevée à 19 heures ($1,78 \pm 0,02\%$) au coucher du soleil.

Composition chimique de l'huile essentielle au cours de la journée

L'analyse GC/SM et GC/FID des différents échantillons d'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims révèle la présence de 49 composés à 7 heures, 54 à 10 heures, 53 à 13 heures, 57 à 16 heures et 56 à 19 heures, représentant plus de 98% de l'hydrodistillat de chaque échantillon (Tableau 2). Ces composés dont les taux varient au cours de la journée sont surtout des monoterpènes et des sesquiterpènes oxygénés ou non (Figure 1). Très élevé le matin à 7 heures, le taux des monoterpènes (91,14%) décroît progressivement jusqu'à 57,15% à 13 heures avant de remonter à 84,36% à 19 heures le soir (Figure 2). Les monoterpènes hydrocarbonés (38,75 à 57,57%) sont plus abondants dans la plante que les oxygénés (16,7 à 35,89%). Par contre, les sesquiterpènes ont un comportement opposé. Faibles le matin à 7 heures (6,82%) leur taux croît jusqu'à son maximum à 13 heures (40,74%) avant de décroître progressivement pour atteindre 13,51% à 19 heures. Cette variation est surtout due aux sesquiterpènes hydrocarbonés car le taux des oxygénés reste inférieur à 2,5% dans tous les échantillons étudiés. Quant aux composés des autres groupes chimiques de l'huile, ils présentent un taux très faible (inférieur à 2,5%) à tous les moments de récolte de la journée.

En étudiant les composants de l'huile essentielle au cours de la journée, on note des différences pour presque tous les constituants et surtout pour les huit composés de taux au moins égal à 4,5% à l'un des moments de récolte. Dans l'ordre de sortie de la colonne, nous avons : α -thujène (5,56 à 7,85%), β -myrcène (2 à 6,94%), δ -3-carène (3,07 à 4,84%), *p*-cymène (14,61 à 22,8%), γ -terpinène (6,05 à 10,7%), carvacrol (7,94 à 30,8%), β -caryophyllène (0,15 à 18,86%) et β -sélénène (2,74 à 14,41%) dont les taux varient au cours de la journée et la somme des taux à

chaque moment de récolte est supérieure à 75% de l'huile (Figure 3).

Activités antibactériennes des différents échantillons d'huile essentielle

Tous les échantillons d'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims ont été actifs (score 10) au criblage primaire sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19609 et *Staphylococcus aureus* résistante 1199B NorA. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes huiles sur les six germes étudiés ont été alors déterminées et regroupées dans le Tableau 3. Les valeurs de CMI varient au cours de la journée et d'une bactérie à une autre. En dehors de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sur lequel les CMI sont supérieures à 11,5 mg/ml, tous les échantillons d'huile inhibent fortement les bactéries testées. Les autres bactéries gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25923 et *Acinetobacter baumannii* ATCC 19609) présentent des valeurs de CMI inférieures à 3 mg/ml. Quant aux bactéries gram positif testées, elles montrent pratiquement la même allure de sensibilité aux échantillons d'huile essentielle obtenus à différents moments de la journée. Leurs plus faibles valeurs de CMI se retrouvent avec les huiles essentielles de 7 heures et de 19 heures (2,88 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 0,38 mg/ml pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et 1,44 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* résistante 1199B NorA). Ces valeurs croissent de 7 heures à 10 heures (5,75 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 1,44 mg/ml pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et 2,88 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* résistante 1199B NorA) et de 10 heures à 13 heures (7,19 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 2,88 mg/ml pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et 4,32 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* résistante 1199B NorA) avant de décroître progressivement jusqu'à 19 heures.

Tableau 1 : Rendement en huile essentielle en fonction du moment de récolte dans la journée.

Echantillons de OC	E7h	E10h	E13	E16h	E19h
*Rendement (%)	1,71±0,01	1,69±0,02	1,35±0,01	1,70±0,01	1,78±0,02

OC = *Ocimum canum* ; *moyenne de trois extraction par échantillon ; E7h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 7 heures du matin ; E10 h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé le matin à 10 heures ; E13h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 13 heures ; E16 h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé le soir à 16 heures ; E19h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 19 heures le soir.

Tableau 2 : Composition chimique en pourcentage (%) de l'huile essentielle de *Ocimum canum* à différents moments de la journée.

Pic	IK	Constituants de OC	E7h	E10h	E13h	E16h	E19h
1	846	4-hydroxy-4-methyl-pentan-2-one*** ^o	0,09	0,15	0,09	0,1	0,08
2	935	α -thujène* ^h	7,85	7,31	7,14	7,48	5,56
3	941	α -Pinène* ^h	0,5	0,51	0,91	0,64	0,36
4	956	camphène * ^h	0,21	0,16	0,11	0,2	0,13
5	976	sabinène * ^h	1,14	1,07	0,28	1,5	0,89
6	980	β - pinène* ^h	0,25	0,26	0,32	0,35	0,2
7	991	β -myrcène* ^h	5,92	4,45	2,00	6,94	4,62
8	1006	α -phellandrène* ^h	0,42	0,48	0,19	0,62	0,35
9	1008	δ -3-carène* ^h	3,66	4,59	3,16	4,84	3,07
10	1017	α -terpinène* ^h	1,93	0,48	2,01	1,46	2,09
11	1025	<i>p</i> - cymène* ^h	22,8	19,5	14,61	17,8	19,1
12	1029	β -limonène* ^h	1,04	1,08	0,65	1,8	1,04
13	1031	β -phellandrène* ^h	0,23	0,2	0,23	0,19	0,15
14	1036	(<i>Z</i>)- β -ocimène* ^h	0,35	0,21	0,29	0,38	0,28
15	1047	(<i>E</i>)- β -ocimène* ^h	0,23	0,05	0,12	0,2	0,21
16	1059	γ -terpinène* ^h	10,70	8,26	6,05	7,75	10,10
17	1071	<i>cis</i> hydrate de sabinène* ^o	0,13	0,05	0,13	0,08	0,11
18	1085	terpinolène* ^h	0,22	0,11	0,11	0,12	0,2
19	1090	<i>p</i> -cyménène* ^h	0,12	0,1	0,57	0,18	0,12
20	1100	linalol* ^o	0,02	0,01	0,1	0,02	0,02
21	1101	<i>trans</i> hydrate de sabinène* ^o	0,06	0,03	0,15	0,05	0,05
22	1119	<i>trans</i> thujone* ^o	0,24	0,08	0,09	0,07	0,26
23	1126	<i>cis</i> menth-2-èn-1-ol* ^o	0,05	0,04	0,07	0,03	0,07
24	1143	geranial* ^o	0,1	-	-	0,04	0,1

25	1144	<i>trans</i> menth-2-èn- 1-ol* ^o	0,02	0,01	0,06	0,02	0,02
26	1146	camphor* ^o	0,12	2,15	3,05	0,04	0,12
27	1174	bornéol* ^o	2,00	1,63	0,48	1,54	1,7
28	1182	terpinene- 4- ol* ^o	1,08	0,34	3,78	0,73	0,94
29	1188	p-cymene-8-ol* ^o	0,52	0,18	0,33	0,13	0,46
30	1198	esdragol* ^o	-	0,08	0,13	0,11	0,13
31	1238	néral* ^o	-	0,17	0,16	0,27	-
32	1250	chavicol* ^o	0,04	0,03	0,13	0,09	0,83
33	1298	carvacrol* ^o	29	16,1	7,94	13,24	30,80
34	1351	eugenol * ^o	0,19	0,31	1,8	0,24	0,28
35	1376	α -copaene** ^h	0,17	0,13	0,11	0,22	0,08
36	1389	β -élémente** ^h	0,69	1,38	0,13	2,52	1,09
37	1398	méthyl eugenol*** ^o	-	0,09	0,31	0,09	0,03
38	1417	α -caryophyllene** ^h	0,25	1,55	2,12	0,82	0,33
39	1421	β -caryophyllène** ^h	0,15	11,3	18,86	9,5	3,58
40	1433	<i>trans</i> - α - bergamotène** ^h	0,29	0,43	0,22	0,29	0,26
41	1457	α -farnesene** ^h	0,06	0,01	0,36	0,04	0,05
42	1482	germancrene-D** ^h	0,17	1,07	0,33	1,08	0,28
43	1490	β -sélinène** ^h	2,74	8,2	14,41	10,5	4,74
44	1496	α -sélinène** ^h	0,04	0,03	0,8	0,04	0,05
45	1512	acétate d eugényle*** ^o	-	0,2	0,14	0,04	0,61
46	1517	δ -cadinene** ^h	0,31	1,6	1,1	0,97	0,4
47	1520	7-épi- α -sélinène** ^h	0,13	0,78	0,19	0,47	0,38
48	1563	Z-nerolidol** ^o	-	0,01	0,02	0,02	0,07
49	1578	spathulenol** ^o	0,06	0,1	0,7	0,2	0,05
50	1584	caryophylleneoxide ** ^o	0,35	0,16	0,7	0,53	0,46
51	1585	epiglobulol** ^o	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03
52	1646	α -muurolol** ^o	0,1	0,13	0,2	0,22	0,11
53	1647	cubanol** ^o	-	-	-	0,13	0,33
54	1654	α -cadinol** ^o	-	-	-	0,04	0,1
55	1686	α -bisabolol** ^o	1,21	0,81	0,28	0,58	1,05
56	1734	curcumenol** ^o	0,06	0,01	0,18	0,02	0,02
57	1761	cislanceol** ^o	-	0,03	-	0,09	0,05
		Non détectés	1,95	1,77	1,57	2,3	1,41
		Total	100	100	100	100	100

IK = indice de Kovats ; OC = *Ocimum canum* ; E7h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 7 heures du matin ; E10 h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé le matin à 10 heures ; E13h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 13 heures ; E16 h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé le soir à 16 heures ; E19h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 19 heures le soir ; (-) = trace (inférieur ou égale à 0,01%) ; * = monoterpènes ; ** = sesquiterpènes ; *** = non terpènes ; ^h = hydrocarboné ; ^o = oxygéné.

Tableau 3 : Valeurs des CMI (mg/ml) des échantillons d'huile essentielle vis-à-vis des souches bactériennes sensibles et résistantes.

Microorganisme Echantillons de OC	E7h	E10h	E13	E16h	E19h
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,88	5,75	7,19	5,75	2,88
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,38	1,44	2,88	1,44	0,38
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	0,36<CMI<2,87	1,44	2,88	1,44	2,88
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	>11,5	>11,5	>11,5	>11,5	>11,5
<i>Acinetobacterbaumannii</i> ATCC 19609	0,72<CMI<2,87	1,44	2,88	2,88	1,44
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante 1199B NorA	1,44	2,88	4,32	2,88	1,44

OC = *Ocimum canum* ; E7h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 7 heures du matin ; E10 h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé le matin à 10 heures ; E13h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 13 heures ; E16 h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé le soir à 16 heures ; E19h = échantillon de *Ocimum canum* prélevé à 19 heures le soir.

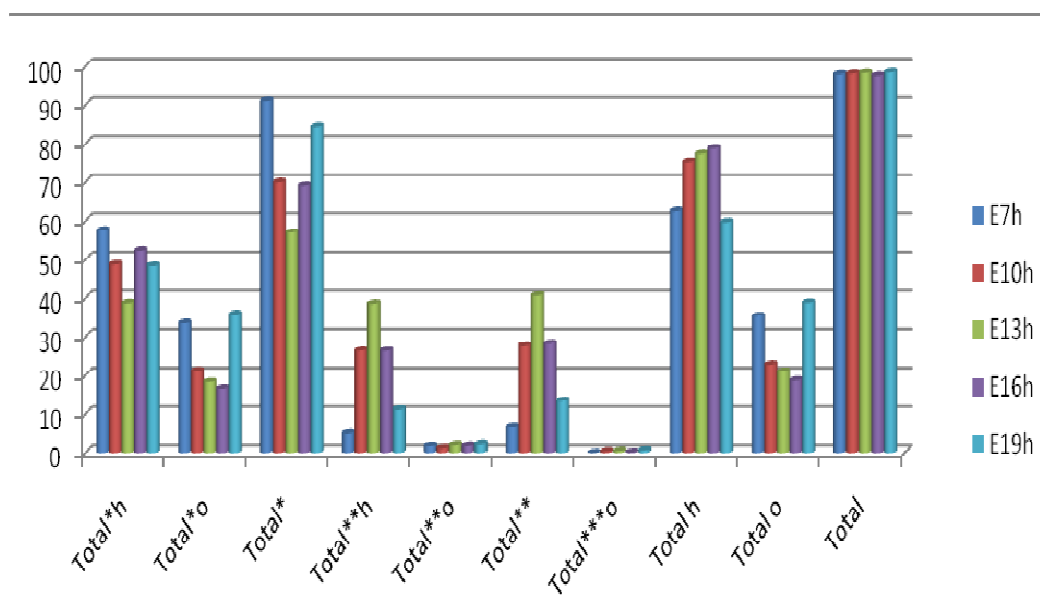


Figure 1 : Groupes chimiques présents dans les échantillons de différentes heures (E7h, E10h, E13h, E16h, E19h) de la journée (* = monoterpènes, ** = sesquiterpènes, *** = non terpènes, ^h = hydrocarboné, ^o = oxygéné).

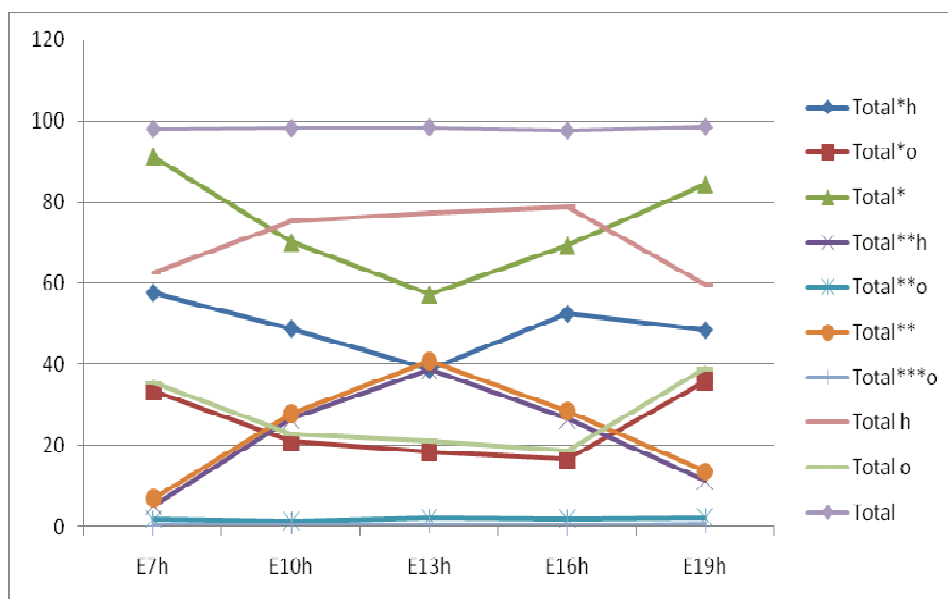


Figure 2 : Evolution des groupes chimiques de l'huile essentielle (E7h, E10h, E13h, E16h, E19h) au cours de la journée (* = monoterpènes, ** = sesquiterpènes, *** = non terpènes, ^h = hydrocarboné, ^o = oxygéné).

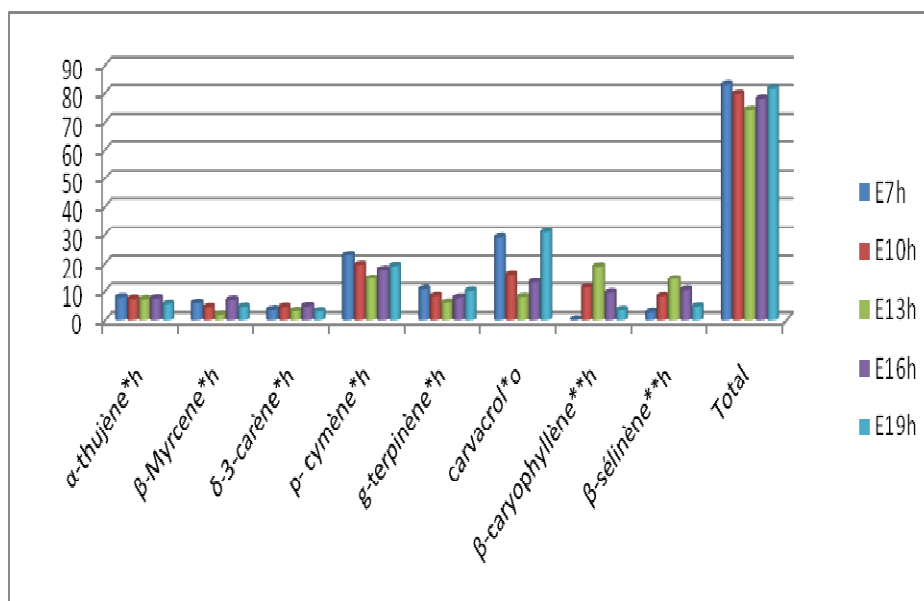


Figure 3 : Variation des composés majoritaires de l'huile essentielle (E7h, E10h, E13h, E16h, E19h) au cours de la journée. * = monoterpènes, ** = sesquiterpènes, *** = non terpènes, ^h = hydrocarboné, ^o = oxygéné.

DISCUSSION

Variation diurne du rendement et des constituants de l'huile essentielle

Les résultats obtenus prouvent que le rendement en huile essentielle de *Ocimum canum* varie en fonction du moment de récolte dans la journée. Ceci confirme les résultats antérieurs de Yayi et al. (2001). Cette variation des taux d'huile se traduit par un minimum à 13 heures et semble se justifier par une évaporation de l'huile essentielle sous l'effet du soleil. Les rendements obtenus, même à 13 heures, pour les échantillons du Sud-Bénin sont proches de ceux du Burkina Faso, du Brésil et des Iles Comores (1 à 2,06%) (Alfa et al., 2004; Bassole, 2005; Goretti et al., 2008; Hassan et al., 2011) pour la même espèce, mais nettement supérieurs à celui trouvé par Tchoumboungang et al. (2005a, 2009b) au Cameroun (0,59%). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'influence des facteurs comme le lieu de récolte, le stade végétatif et les conditions microclimatique et édaphique de chaque région (Hassane, 2011).

L'analyse de la variation des composants des différents échantillons d'huile essentielle révèle deux groupes de composés ayant des comportements opposés. Le groupe le plus faible, composé de β -caryophyllène et β -sélinène, présente un taux faible le matin à 7 heures. Ce taux croît avec l'apparition du soleil pour atteindre son maximum quand le soleil est au zénith à 13 heures puis décroît avec la disparition du soleil jusqu'à 19 heures. Le second groupe comporte entre autres, les composés les plus abondants de la plupart des échantillons étudiés (*p*-cymène et carvacrol) et présente une variation contraire à celle du premier groupe au cours de l'ensoleillement. Ce groupe impose son comportement à la somme des huit composés majoritaires de l'huile. Le seul composé oxygéné des huit, un monoterpène (carvacrol), appartient à ce groupe. L'examen des taux des composés majoritaires de chaque échantillon montre un chémotype à *p*-cymène et carvacrol à 7 heures et 19 heures; un chémotype à *p*-cymène, carvacrol et β -caryophyllène à 10 heures; un chémotype à *p*-cymène, β -caryophyllène et β -

sélinène à 13 heures et un chémotype à *p*-cymène, carvacrol et β -sélinène à 16 heures. Ces différents chémotypes n'ont encore jamais été décrits au Bénin. Cette variation de chémotypes observée sur le même site au cours de la journée peut s'expliquer par l'interconversion d'un composé en un autre sous l'effet des rayons solaires (Poulose and Croteau, 1978; Yayi et al., 2001) et justifie en partie la variété de chémotypes décrit pour cette espèce à travers la littérature au Bénin (Yayi et al., 2001) et dans d'autres pays comme le Togo, le Rwanda (Ntezurubanza et al., 1985), le Nigeria (Ekundayo et al., 1989), le Mali (Chalchat et al., 1995), la Guinée (60%) (Nianga et al., 1995), le Burkina Faso (Bassole et al., 2005; Goretti et al., 2008), Sao Tomé (Martins et al., 1999) et dans l'île de la Grande Comore (Hassane et al., 2011). La variation des composés majoritaires de *Ocimum canum* est différente de celle décrite pour l'*Ocimum gratissimum* du Bénin (Yayi et al., 2004) mais proche de celle décrite par De Vasconcelos et al. (1999) pour cette même plante au Brésil.

Impact de la variation diurne sur les activités antibactériennes

Les valeurs de CMI obtenues au cours de la journée prouvent que la variation diurne de la composition chimique influence l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Ocimum canum* du Bénin. L'inhibition par cette huile des bactéries gram positif étudiées dans le présent travail diminue avec l'ensoleillement. Les composés majoritaires de l'huile, de taux présentant le même comportement face à l'ensoleillement comme carvacrol, *p*-cymène et γ -terpinène, dont certaines propriétés antimicrobiennes de certains sont connues (Dorman and Deans, 2000; Knowles et al., 2005; Nostro et al., 2009) seraient responsables de cette inhibition. Il conviendra de tester ces composés séparément et en différentes combinaisons pour élucider leur effet de synergie sur ces germes. L'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims récoltée à 7 heures ou 19 heures sur notre site peut être

recommandée pour traiter à faible dose, les affections dues à ces germes comme des folliculites, furoncles, sycosis, anthrax, orgelets, hidrosadénites panaris, endocardites et abcès à localisations variées (sein, fesse, marge de l'anus, aisselle, aine.....), ainsi que des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme (Joly-Guillou et al., 2004; Fisher and Phillips, 2009). Il conviendra de faire des tests *in vivo* pour confirmer ces observations. Quant aux bactéries gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25923 et *Acinetobacter baumannii* ATCC 19609) utilisées dans la présente étude, elles sont très sensibles à tous les échantillons d'huile testés. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 reste le seul germe peut sensible à l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims dans le présent travail. D'une façon générale, le moment de récolte dans la journée influence l'activité bactérienne de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims à cause de la variation diurne de la composition chimique de cette huile qui perturbe la synergie d'action de ses constituants sur les bactéries. Les travaux antérieurs ont montré que les réactions de synergie entre les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires (Franchomme, 1981; Gueldener et al., 1985; Burt, 2004; Lahlou, 2004).

Conclusion

Nos travaux ont permis de montrer que le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims varient en fonction du moment de récolte dans la journée et de l'ensoleillement. Abondant le matin, le rendement en huile décroît jusqu'à son taux minimum ($1,33 \pm 0,01\%$) à 13 heures avant de remonter à sa valeur la plus élevée le soir. Deux comportements s'observent au niveau des composés de l'huile. Certains constituants comme β -caryophyllène et β -sélinène voient leur taux croître avec l'ensoleillement au moment où d'autres comme carvacrol et *p*-cymène, présentent des taux décroissant sous l'impact du même facteur. Cette variation influence les

propriétés antibactériennes de l'huile qui présente une forte activité inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19609 et *Staphylococcus aureus* résistante 1199B NorA. Les huiles obtenues de la plante récoltée à 7 heures et à 19 heures sont les plus efficaces à faible concentration.

REMERCIEMENTS

Tous nos remerciements à l'IFS (International Foundation for Science) pour le financement de ce travail à travers la bourse IFS N°2559-2 et le stage pratique à l'Ecole Normale Supérieure de Chimie de Paris, à l'issue duquel le présent travail a été finalisé. Merci à l'équipe de Eva ROSTIG (Program Administrator of Natural products Area), Ulrika HUSS (Scientific Program Coordinator of natural Products) et Ingrid LINDHE (Program Administrator of Crop Science Area).

REFERENCES

- Adams RP. 1995. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. Allured Publ. Corp: Carol Stream, IL, USA; 18-43; 57-332.
- Adjanohoun EJ, Adjakidjè V, Ahyi MRA, AkéAssi L, Akoègninou A, d'Almeida J, Apovo F, Boukef K, Chadare M, Cusset G, Draman K, Eyme J, Gassita JN, Gbaguidi N, Goudote E, Guinko S, Hounnon PLI, Keita A, Kiniffo HV, Kone-Bamba D, MusampaNseyya A, SaadouM, Sodogandji T, De Souza S, Tchabi A, ZinsouDossa C, Zohoun T. 1989. *Contribution aux Etudes Ethnobotaniques et Floristiques en République Populaire du Bénin*. Agence de Coopération Culturelle et Technique: Paris, France ; 274-282.
- AFNOR. 2000. *Recueil de Normes Françaises, Huiles Essentielles* (Tome I) échantillonnage et méthodes d'analyses. NFT74-401: Paris ; 207-208.

- Alfa KD, Abdoul DS, Mouhoussine N. 2004. Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Lin., Syn. *Ocimum canum* Sims. *C. R. Chim.*, **7**: 1033–1037.
- Anton R, Lobstein A. 2005. *Plantes Aromatiques. Épices, Aromates, Condiments et Huiles Essentielles*. Tec & Doc: Paris ; 522.
- Baba-Moussa F, Koumaglo K, Ayedoun A, Akpagana K, Moudachirou M, Bouchet P. 1997. Antifungal activity of essential oils extracted in the African states of Togo and Benin. *Cryptogamie Mycologie*, 165-168.
- Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore Z, Traore SA. 2001. Composition chimique et activités antibactériennes des huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *cymbopogon proximus* (stapf.) et de *Ocimum canum* (Sims). *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **11**: 37-51.
- Bassole Nebie R, Savadogo A, Ouattara CT, Barro N, Traore SA. 2005. Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippiachevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. *Afri. J. Biotech.*, **4**(10): 1156–1160.
- Berhaut J. 1967. *Flore du Sénégal* (2e edn). Clairafrique éd : Dakar, Sénégal; 485.
- Berhaut J. 1975. *Flore Illustrée du Sénégal* (4^e edn) Clairafriqueed.: Dakar, Sénégal; 625.
- Bruneton J. 1993. *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales* (2^{ème} éd). Technique et Documentation-Lavoisier : Paris; 387.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **94**: 223–253.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV. 1995. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca ternifolia* (tea tree oil). *Microbios.*, **82**: 181-185.
- Chalchat JC, Garry RPH, Harama M, Sidibe L. 1995. Plantes aromatiques du Mali. Etude de deux *Ocimum*: *O. basilicum* L., *O. canum* Sims. *Rivista Italiana EPPOS*, 204-214.
- Clevenger JF. 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **7**: 346.
- De Vasconcelos Silva MG, Craveiro AA, Abreu Matos FJ, Machado MIL, Alencar JW. 1999. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia*, **70**(1): 32–34.
- Dorman HJD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Applied Microbiol.*, **88**: 308–316.
- Ekundayo O, Laakso I, Hiltunen R. 1989. Constituents of the volatile oil from leaves of *Ocimum canum* Sims. *Flav. Fragr. J.*, **4**: 17–18.
- Fisher K, Phillips C 2009. "The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus". *Microbiology*, **155**(6): 1749–1757.
- Franchomme P. 1981. L'aromatologie à visée anti-infectieuse. *Phytoméd.*, **1–2**: 25–47.
- Goretti M, Silva V, Vieira IGP, Mendes FNP, Albuquerque IL, dos Santos RN, Silva FO, Morais SM. 2008. Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from Northeastern Brazil. *Molecules*, **13**(10): 2482–2487.
- Guedener RC, Wilson DM, Heidt A. 1985. Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*. *J. Agri. Food.*, **33**: 413–419.
- Hassane SOS, Ghanmi M, Satrani B, Farah A, Amarti F, Achm SM, Chaouch A. 2011. Composition chimique et bioactivité des huiles essentielles de deux provenances de *Ocimum canum* S. de l'île de la Grande Comore. *Phytothérapie*, **9**: 18–24.
- Heneberg D, Weimann B, Jopperk W. 1994. Mass spectrometry library search system masslib, Version 7.4 (for Ultrix), Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, mülheim/Rhur.

- Hutchinson J, Dalziel JM. 1963. *Flora of West Tropical Africa* (Vol. II), Hepper FN (Ed). Crown Agents for Oversea Governments and Administrations: London; 510–562.
- Janssen AM, Scheffer JJC, Ntezurubanza L, Baerhem-Svendsen A. 1989. Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. *J. Ethnopharmacol.*, **26**: 57-63.
- Joly-Guillou M-L, Hidri N. 2004. *Acinetobacter, Maîtrise des Infections Nosocomiales de A à Z*. Editions HEALTH & CO : Paris.
- Kaou AM, Mahiou-Leddet V, Hutter S, Ainouddine S, Hassani S, YahayaI, Azas N, Ollivier E. 2008. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **116**(4): 74–83.
- Knowles JR, Roller S, Murray DB, Naidu AS. 2005. Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(2): 797–803.
- Lahlou M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.*, **18**: 435–448.
- Lukwa N. 1994. Do traditional mosquito repellent plants work as mosquito larvicides. *Africa. J. Med.*, **40**: 306-309.
- Martins AP, Salgueiro L, Vila R, Tomi F, Cañigüeral S, Casanova J, da Cunha AP, Adzet T. 1999. Composition of the essential oil of *Ocimum canum*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum minimum*. *Plant. Med.*, **65**: 187–189.
- Masada Y. 1976. *Analysis of Essential Oils Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. Wiley: New York; 193–199.
- Mclafferty FW, Stauffer DB. 1993. Mass Spectrometry Library Search System Bench Top/PBM, Version 3.0, Palisade Co., Newfield NY. Using Bench Top/PBM the following database was searched
- Mclafferty: FW, Stauffer DB. 1991. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data* (5th edn). Wiley and Son: New York.
- Monjoin M. 1981. Possibilité d'utiliser la médecine traditionnelle pour améliorer les soins de santé primaire aux Comores. Thèse de doctorat (PhD), Université de Bordeaux-II, Bordeaux-II, p.340.
- Morton. 1981. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America I*. Springfield: Illinois, USA; 745-750.
- National Institute of Standard and Technology. 1994. PC Version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Data Base, Version 4.5. U.S. Department of Commerce: Gaithersburg, MD.
- NCCLS. 2003. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Information Supplement*, M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA.
- Nianga MN, Camara B, Sylla AB, Kolie C, Bombily MS, Savend S, Benjilali B, Roy R, Arnason TJ. 1995. Produits naturels d'origine végétale en République de Guinée. 3^e colloque Saint Jean-sur Richelieu, Richelieu; 3-16.
- Nostro A, Marino A, Blanco AR, Cellini L, Di Giulio M, Pizzimenti F, Roccaro AS, Bisignano G. 2009. *In vitro* activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *J. Med. Microbiol.*, **58**: 791–797.
- Ntezurubanza L, Scheffer JJ, Looman A. 1985. Composition of the essential oil of *Ocimum canum* grown in Rwanda. *Pharmaceutish. Weekbl. Sci.*, **13**: 273-276.
- Oussou KR, Kanko C, Guessend N, Yolou S, Koukoua G, Dosso M, N'Guessan YT, Figueredo G, Chalchat J-C. 2004. Antibacterial activities of essential oils of three aromatic plants from Ivory Coast: Biologically active substances extracted from medicinal plants and essential oils from aromatic plants of West Africa. *C. R. Chim.*, **7**(10-11): 1081–1086.

- Paton A. 1992. A synopsis of *Ocimum* L. (*Labiatae*). *Afri. Kew. Bul.*, **47**: 403–435.
- Poulose AJ, Croteau R. 1978. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of gamma-terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**: 307-321.
- Pousset JL. 1989. *Plantes Médicinales Africaines*. Ellipses. Agence de Coopération Culturelles et Techniques : Paris; 102-103.
- Sadler Research Laboratories. 1986. The Sadler standard gas chromatography retention index library, Bio-Rad Laboratories, Philadelphia.
- Sanda K, Koba K, Nambo PA, Gaset A. 1998. Chemical investigation of *Ocimum* species growing in Togo. *Flavour. Fragr. J.*, **13**: 226-232.
- Sandra P, Bicchi C. 1987. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, Hüthig DA (ed). Heidelberg; 259-274; 287-328.
- Stewart WW, TopulRali, David N Leach. 2008. Volatile chemical constituents of three *Ocimum* species (*Lamiaceae*). *South Pacific J. Nat. Sci.*, **26**: 25.
- Tchoumboungang F, Dongmo PMJ, Sameza ML, Mbanjo EGN, Fotso GBT, Amvam Zollo PH, Menut C. 2009. Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(1): 77–84.
- Tchoumboungang F, Zollo PH, Dagne E, Mekonnen Y. 2005. *In vivo* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Planta Med.*, **71**: 20–23.
- Yayi E, Gbénou JD, Ahoussi LA, Moudachirou M, Chalchat JC. 2004. *Ocimum gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement. *C. R. Chim.*, **7**(10): 1013–1018.
- Yayi E, Moudachirou M, Chalchat JC. 2001. Chemotyping of three *Ocimum* species from Benin. *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum*, *Ocimum gratissimum*. *J. Essent. Oil Res.*, **13**: 13–17.