

Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

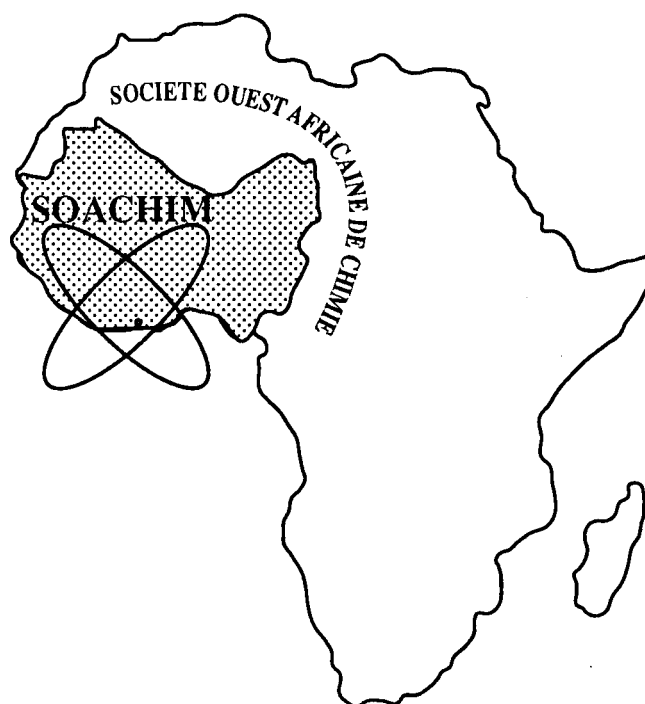
J. Soc. Ouest-Afr. Chim.

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

ISSN 0796-6687

18^{ème} Année, Juin 2013, N° 035



Site Web: <http://www.soachim.org>

Composition chimique et test d'efficacité *in vitro* des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (*Ocimum basilicum*) et du basilic tropical (*Ocimum gratissimum*) sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon.

Marc Tchokponhoue Kpodekon¹, Kadoeito Cyrille Boko^{1,2*}, Jacques Georges Mainil²
Souaibou Farougou¹, Philippe Sessou³, Boniface Yehouenou³, Joachim Gbenou⁴,
Jean-Noel Duprez², Marjorie. Bardiau²

¹Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, EPAC/UAC, 01 BP : 2009 Cotonou, Bénin

²Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, Liège, Belgique

³Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée, EPAC/UAC, 01 BP : 2009 Cotonou, Bénin

⁴Laboratoire de Pharmacognosie et de chimie des Huiles Essentielles FSS-FAST/UAC, ISBA Cotonou, Bénin

(Reçu le 18/01/2012 – Accepté après corrections le 26 /06/2013)

Résumé : Dans le présent travail nous avons étudié les compositions chimiques et les activités antibactériennes des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon, deux bactéries impliquées dans la mortalité de pintades dans les élevages au Nord du Bénin. 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 composés majoritaires identifiés sont, pour *Ocimum basilicum*, l'estragole (31,3 %), le linalol (24,0 %), l'eugénol (21,7 %) et, pour *Ocimum gratissimum*, le thymol (43,4 %), le para-cymène (12,3 %) et le γ -terpinène (12,1 %). Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) déterminées pour les deux huiles varient respectivement de 8.10^{-3} mg/ml à 18.10^{-3} mg/ml et de 16.10^{-3} mg/ml à 144.10^{-3} mg/ml. En conclusion, ceci montre que ces deux huiles possèdent des activités antibactériennes très intéressantes contre les deux sérotypes étudiés de *Salmonella enterica*.

Mots clés : *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, activités antibactériennes, *Salmonella* Legon, *Salmonella* Oakland, CMI, CMB.

Chemical composition and *in vitro* test of efficacy of essential oils extracted from fresh leaves of commun basilic (*Ocimum basilicum*) and of tropical basilic (*Ocimum gratissimum*) against *Salmonella enterica* serotype Oakland and *Salmonella enterica* serotype Legon

Abstract : In the present study we have determined the chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils extracted from fresh leaves of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* against *Salmonella enterica* serotype Oakland et *Salmonella enterica* serotype Legon, two bacteria implicated in guinea fowl mortality in the North Benin breedings. Extracted by Hydrodistillation and analysed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography quadruple Mass Spectrometry (GC/MS), the major components are for *Ocimum basilicum*, estragole (31.3 %), linalol (24.0 %) eugenol (21.7 %) and for *Ocimum gratissimum*, thymol (43.4 %), para-cymene (12.3 %) and γ -terpinene (12.1 %). The Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and the Minimal Bactericide Concentrations (MBC) determined for these two essentials oils vary respectively from 8.10^{-3} mg/ml to 18.10^{-3} mg/ml and from 16.10^{-3} mg/ml to 144.10^{-3} mg/ml.

In conclusion, this results show that these oils possess strong antibacterial activities against the two serotypes of *Salmonella enterica*.

Key words: *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, antibacterial activities, *Salmonella* Legon, *Salmonella* Oakland, CMI, CMB,

* Auteur correspondant : cyrilleboko@yahoo.fr

1. Introduction

Les effets secondaires de plus en plus dangereux des molécules de synthèse ont conduit ces dernières années à l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques ^[1,2,3,4]. Dans ce cadre, la pharmacologie africaine en général, et béninoise en particulier, s'intéressent aux différentes activités biologiques des extraits végétaux des plantes aromatiques ^[5]. La pharmacopée béninoise regorge de plusieurs plantes ayant des propriétés antimicrobiennes qui méritent d'être investiguées. Les plantes d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* poussent dans toutes les régions du pays et sont très largement utilisées par les populations locales, qui les mettent couramment en culture autour des habitations et les proposent sur les marchés locaux. En médecine traditionnelle humaine, les feuilles d'*Ocimum basilicum* sont utilisées pour traiter certaines affections telles que les indigestions, les nausées, les crampes abdominales, les gastroentérites, les migraines, les dépressions, la gonococcie, la dysenterie et les diarrhées chroniques ^[6]. Les feuilles d'*Ocimum gratissimum* sont utilisées dans le traitement des diarrhées et des infections du tractus respiratoire ^[7]. Les huiles essentielles des feuilles d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* ont quant à elles révélé des activités antibactériennes ^[8,9,10,11,12] qui pourraient être utiles en médecine vétérinaire.

Au Bénin, les extraits de plantes médicinales ont été testés en priorité sur les grands et petits ruminants au détriment de la volaille. Certains éleveurs utilisent de façon empirique des extraits de plantes pour guérir certaines maladies du bétail. Pourtant l'élevage de volaille est une filière agricole qui présente également des problèmes sanitaires. Ainsi deux sérotypes de *Salmonella enterica* ont été détectés et isolés chez des pintades de races locales élevées dans le département du Borgou au Nord-Est du Bénin et mortes suite aux signes cliniques comme la frilosité, la prostration, la diarrhée blanchâtre et la perte d'appétit ^[13]. La thérapie couramment appliquée par les éleveurs est un antibiotique de synthèse à base de fluméquine. Toutefois, les difficultés d'approvisionnement en fluméquine dans les zones reculées d'élevage conjuguées au faible pouvoir d'achat de médicaments par les éleveurs rendent difficile leur utilisation. La recherche d'une thérapeutique alternative s'impose donc pour remédier à cette pathologie dans les élevages de pintades. Cette étude se propose donc de vérifier les vertus thérapeutiques antisalmonelliques d'extraits de feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* de la flore béninoise en vue d'une

éventuelle substitution de la fluméquine dans les élevages de volaille au Bénin. Ceci contribuerait à la valorisation, au plan scientifique, de ces deux plantes médicinales utilisées par les aviculteurs béninois et permettrait de diminuer la prévalence de l'antibiorésistance bactérienne.

Les objectifs spécifiques de ce travail se résument à l'étude des compositions chimiques des extraits volatils des deux plantes précitées et à l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes sur ces deux souches isolées de cas de salmonellose au Nord-Est du Bénin.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal étudié est constitué des feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* respectivement récoltées à Abomey-Calavi (6°26'56,20"N et 2°21'00,88"E) et à Dassa-Zoumé (7°46'15,58"N et 2°11'49,78"E). Ces deux localités bénéficient 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 ^[14]. *Ocimum basilicum* a été identifié sous le n° AA 6372/HNB et l'*Ocimum gratissimum* sous le n° AA 6373/HNB.

2.1.2. Matériel bactériologique

Les tests microbiologiques ont été effectués au Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée (LERCA) de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) au Bénin. Les bactéries ont été isolées des élevages de pintade dans le département du Borgou au Nord-Est du Bénin. Ces bactéries ont été typées en Belgique au Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA-CODA), section Bactériologie. Deux sérotypes ont été identifiés. Il s'agit de *Salmonella enterica* sérotype Legon et de *Salmonella enterica* sérotype Oakland. Ces souches ont ensuite été ramenées au Laboratoire de diagnostic vétérinaire de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC).

2.2. Méthodologie

2.2.1. Extraction des huiles essentielles

La technique d'extraction des huiles essentielles (HE) utilisée dans cette étude est l'hydrodistillation. Celle-ci a été réalisée à partir de 300g de feuilles

fraîches à l'aide d'un extracteur de type cleverger pendant trois heures au Laboratoire de pharmacognosie et des huiles essentielles de Cotonou au Bénin. Les extraits volatils ont ensuite été séchés à l'aide de sulfate de sodium anhydre puis conservés dans des flacons teintés afin de limiter les effets éventuels de la lumière^[15].

2.2.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles et contrôle de stérilité

Afin de déterminer leur composition chimique, les huiles essentielles extraites ont été analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) à l'aide d'un appareil Deloi DI 200[®] muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne DB5 (L : 25 m, diamètre : 0,25 mm et Di : 0,25 µm). L'identification des composés chimiques a été réalisée par CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM).

Afin de confirmer l'absence de microorganismes (moisissures et bactéries) dans les extraits, les huiles essentielles ont été ensemencées sur de la gélose de type Sabouraud et de type Muller Hinton Agar.

2.2.3 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des huiles essentielles

Deux solutions mères des deux huiles essentielles ont été réalisées à partir de 2 ml de bouillon Mueller Hinton stérile, 40 µl d'huile essentielle et une goutte de Tween 80^[16].

La CMI a été déterminée comme précédemment décrite par Yehouéou et al.^[17]. Brièvement, 100 µl de bouillon Mueller Hinton contenant du rouge de phénol à 0,02 g/l ont été distribués dans chaque puit d'une microplaque à 96 puits. Cent microlitres de la solution mère de l'extrait ont ensuite été ajoutés à chacun des puits de la première colonne (A, C, D, E, F, G, H) de la microplaque sauf celui de la seconde rangée (B). Des dilutions successives de raison 2, puits par puits, ont été réalisées jusqu'au 12^{ème} puits dans chaque rangée et les 100 µl du dernier puits ont été rejetés. Ensuite, 100 µl de bouillon Mueller Hinton ne contenant pas du rouge de phénol ont été ajoutés dans le premier puit de la seconde rangée et avant de procéder à des dilutions successives toujours de raison 2.

Tous les puits ont été ensemencés, sauf ceux de la première rangée, en y introduisant 100 µl de suspension bactérienne à 10⁶ Unité Formant Colonie (UFC)/ml, densité égale à l'échelle 2 de Mc Farland^[18]. A la place de la suspension bactérienne, ont été mis du bouillon Muller Hinton sans rouge de phénol dans les puits de la première rangée. La microplaque a enfin été recouverte avec du papier

parafilm puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La première rangée représente le témoin négatif tandis que la seconde, le témoin positif.

A la lecture, l'obtention d'une couleur jaune indique une multiplication bactérienne. La persistance de la couleur rouge initiale signifie l'absence de croissance des germes. La CMI est la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance visible n'a été notée. Pour une meilleure évaluation de l'activité des extraits, nous avons effectué six essais pour chaque germe, la valeur de la CMI étant celle qui s'est répétée quatre fois sur les six tests.

La CMB a été déterminée successivement à la CMI. Brièvement, le contenu de chaque cupule, allant de la valeur de la CMI aux concentrations les plus élevées a été ensemencé par strie à la surface de gélose *Salmonella-Shigella* (SS) coulée en boîte de Pétri. Les cupules des rangées des témoins positif et négatif ont également été ensemencées sur la même gélose pour s'assurer de l'absence de croissance des bactéries dans les cupules de la rangée témoin négative et de présence de salmonelles dans les cupules de la rangée positive. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. A la lecture, la CMB est la plus faible concentration d'extrait pour laquelle il y a eu 0,01% de bactéries survivantes pour les cupules test.

2.2.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) Concentration Minimale Bactéricide (CMB) d'antibiotiques conventionnels

Une seule plaque a été utilisée pour tester quatre antibiotiques conventionnels (gentamicine, tétracycline, chloramphénicol, fluméquine). La méthode de dilution utilisant les microplaques à 96 puits a été utilisée^[17]. Dans une plaque de 96 puits, 100 µl d'eau distillée stérile ont été distribués dans les puits de la microplaque sauf ceux de la colonne 3. Ensuite, 100 µl de bouillon Muller Hinton stérile au rouge de phénol (0,02g/l) ont été distribués dans la colonne 2. Après, 100 µl d'antibiotique (256 µl/ml) ont été mis dans chacun des puits des 3^{ème} et 4^{ème} colonnes de la plaque. La gentamicine a été affectée aux lignes A et B, suivi de tétracycline dans les lignes C et D, le chloramphénicol dans les lignes E et F, et la fluméquine dans les lignes G et H. On a par la suite procédé à une dilution successive de raison 2 des puits du n°4 au n° 12 sur chaque ligne. Cent microlitres de bouillon Muller Hinton de la souche Legon (10⁶ UFC/ml, densité égale à l'échelle 2 de Mc Farland) ont été distribués dans les puits des lignes A, C, E, G sauf les puits de la colonne 2 et 100 µl du bouillon de la souche Oakland (10⁶

UFC/ml, densité égale à l'échelle 2 de Mc Farland)^[18] ont été distribués dans les puits des lignes B, D, F, H sauf les puits de la colonne 2. La colonne 1 représente ici le témoin positif et la colonne 2, le témoin négatif. Enfin, la plaque a été recouverte d'un papier de parafilm puis incubée à 37° pendant 24h. La lecture a été faite de la même manière que celles de l'HE.

Pour une meilleure évaluation de l'activité des extraits, l'opération a été répétée six fois, la valeur de la CMI étant celle qui s'est répétée quatre fois sur les six tests.

La procédure de détermination de la CMB est la même que celle décrite dans la section 2.2.3.

2.2.5. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) du thymol

La CMI du thymol pur par rapport aux deux souches a été également testée. La procédure utilisée est la même que celle pour la détermination

de la CMI des antibiotiques conventionnels (Section 2.2.4).

3. Résultats et discussion

3.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles

Le rendement d'extrait en huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* est respectivement de 0,63 % et de 1,24 %. Les rendements des extraits d'huiles essentielles obtenus dans le cadre de cette étude sont supérieurs à ceux de Yayi^[19] qui varient entre 0,1 % et 0,4 %. Un rendement de 0,60 % a été rapporté dans d'autres travaux sur *Ocimum gratissimum* au Cameroun^[20].

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 d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* (tableaux I et II).

Tableau I: Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*

| Composés identifiés | Taux (%) | IK (Index de Kovat) |
|-------------------------|--------------|---------------------|
| delta-3-carène | 0,30 | 998 |
| α-terpinène | 1,30 | 1001 |
| Limonène | 1,14 | 1013 |
| 1,8-cinéol | 0,52 | 1014 |
| trans oct-2-énol | 1,42 | 1037 |
| Linalol | 24,00 | 1074 |
| terpinèn-4-ol | 4,24 | 1157 |
| beta-terpinène | 0,50 | 1195 |
| Estragol | 31,33 | 1225 |
| eugénol | 21,67 | 1325 |
| Méthyleugénol | 1,15 | 1362 |
| trans alpha bergamotène | 4,83 | 1428 |
| alpha humulène | 0,70 | 1454 |
| germacrène D | 0,81 | 1472 |
| Bicyclogermacrène | 0,84 | 1492 |
| alpha murolène | 0,49 | 1493 |
| gamma cadinène | 0,26 | 1495 |
| gamma élémène | 0,40 | 1501 |
| Globulol | 0,13 | 1520 |
| Viridiflorol | 1,76 | 1560 |
| gamma eudesmol | 0,80 | 1602 |
| alpha cadinol | 0,33 | 1621 |
| Oxyde de manoylène | 0,13 | 1630 |
| méthyl linoléate | 0,30 | 1642 |
| Total | 99,35 | |

Tableau II : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum*

| Composés identifiés | Taux (%) | IK (Index de Kovat) |
|--------------------------------------|--------------|---------------------|
| α -thujène | 1,74 | 915 |
| α -pinène | 0,54 | 923 |
| Camphène | 0,07 | 943 |
| β -pinène | 0,25 | 962 |
| Myrcène | 2,69 | 972 |
| α -phellandrène | 0,25 | 996 |
| delta-3-carène | 0,16 | 998 |
| α -terpinène | 2,49 | 1001 |
| Para-cymène | 12,3 | 1012 |
| Limonène | 1,30 | 1013 |
| 1,8-cinéol | 0,33 | 1014 |
| (Z)-b-ocimène | 0,17 | 1035 |
| γ-terpinène | 12,11 | 1051 |
| Terpinolène | 0,28 | 1078 |
| para cyménène | 1,88 | 1079 |
| Linalol | 0,61 | 1084 |
| trans-p-2,8-menthadièn-1-ol | 0,20 | 1086 |
| terpinèn-4-ol | 2,02 | 1157 |
| α -terpinéol | 0,18 | 1197 |
| Estragol | 1,62 | 1225 |
| Thymolmethylether | 0,40 | 1265 |
| Thymol | 43,45 | 1267 |
| Carvacrol | 2,81 | 1274 |
| beta caryophyllène | 3,32 | 1418 |
| trans alpha bergamotène | 0,28 | 1428 |
| alpha humulène | 0,41 | 1454 |
| germacrène D | 0,17 | 1472 |
| beta sélinène | 2,83 | 1492 |
| alpha sélinène | 1,32 | 1502 |
| gamma cadinène | 0,22 | 1514 |
| delta cadinène | 0,33 | 1524 |
| Total | 96,73 | |

Les composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* sont l'estragol (31,33 %), le linalol (24 %) et l'eugénol (21,67 %). Contrairement aux analyses CPG-MS de notre étude, Sajjadi a identifié une proportion davantage élevée de méthyl chavicol (52,4 %) suivi de linalol (20,1 %), d'épi- α -cadinol (5,9 %) et du trans- α -bergamotène (5,2 %) dans l'huile essentielle des feuilles violettes d'*Ocimum basilicum* poussant en Iran^[21]. De plus, les principaux constituants rapportés par cet auteur à partir de l'huile essentielle extraite des feuilles vertes d'*Ocimum basilicum* récoltées à Isfahan sont le méthyl chavicol (40,5 %), le géraniol (27,6 %), le néral (18,5 %) et l'oxyde de caryophyllène (5,4 %) ^[21]. Parmi les trois composés majoritaires obtenus avec les huiles d'*Ocimum basilicum* dans le cadre de cette étude, seul le linalol a été observé dans l'*Ocimum basilicum* variété pourpre ^[21] en Iran. Les trois composés d'*Ocimum basilicum* majoritaires dans la présente étude sont

mentionnés dans les études réalisées par Yayi ^[19], 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 d'*Ocimum basilicum* récolté à Lomé, 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 ^[22]. Les valeurs de la composition chimique des trois composés majoritaires dans notre étude sont largement différentes de celles rapportées par Koba et al. ^[22] 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 %), eugenol (19,2 %), α -cadinol (3,2 %), trans- α -bergamotène (2,7 %) ^[23].

En ce qui concerne l'huile d'*Ocimum gratissimum*, le thymol (43,45 %), le para-cymène (12,26 %) et le γ -terpinène (12,11 %) sont majoritaires. Ces compositions chimiques et les

valeurs de chacune d'elles sont dans les mêmes ordres de grandeur que celle de Yayi ^[19], à la différence que la teneur en thymol dans la présente étude est plus élevée. Dans une étude réalisée au Kenya avec l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum gratissimum*, les composés majoritaires sont constitués d'eugénol (68,8 %), du méthyl eugénol (13,21 %) et du cis-ocimène (7,47 %) ^[24]. 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 ^[25]. Sahouo Bedi *et al.* ^[26] ont également mis en évidence la prédominance du thymol (70,8 %) dans l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* de la Côte d'Ivoire. Dans ce même pays, une étude conduite par Oussou *et al.* ^[27] a permis d'obtenir dans l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum*, le thymol (34,6 %), le p-cimène (25,2 %), α-sélinène (6,8 %), le myrcène (5,4 %), le (E)-β-caryophyllène (4,9 %) et α-thujène (4,5 %). Comme chémotype au Brésil, Cavalcanti *et al.* ^[28] ont isolé dans l'huile essentielle d'*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.* ^[29] ont mis en évidence l'eugénol (61,9 %) et le cis-ocimène (8,2 %) pour cette même plante.

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 et surtout à la structure pédologique sur laquelle les plantes ont poussé.

3.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux huiles essentielles

Les deux huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de *Salmonella* étudiées. Cette activité varie d'une souche à l'autre (tableau III).

Pour *Salmonella* Legon, les CMI sont de 36.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum basilicum* et 8.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum gratissimum* alors que, pour *Salmonella* Oakland, les CMI sont de 18.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum basilicum* et de 16.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum gratissimum*.

Selon Joubert *et al.* ^[30], le rapport CMB/CMI permet de déterminer le pouvoir antibiotique de l'huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, on dit que l'extrait est bactéricide et lorsqu'il est supérieur à 4, l'extrait est qualifié de bactériostatique. L'analyse du tableau III ci-dessus montre que les huiles essentielles étudiées sont bactéricides et que l'huile d'*Ocimum gratissimum* est plus active que celle d'*Ocimum basilicum*. Dans une étude réalisée au Burkina Faso qui consistait à déterminer les CMI de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* contre plusieurs bactéries, Bassolé *et al.* ^[23] ont déterminé une CMI de 5 mg/ml pour *S. enterica* CIP 105150 et *S. typhimurium* ATCC 13311, 8,3 mg/ml pour *Escherichia coli* CIP 105182 et 2,5 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Dans une étude au Pakistan, Shafique *et al.* ^[12] ont étudié l'activité antibiotique de l'huile d'*Ocimum basilicum* contre six souches bactériennes : *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*. Cette étude a révélé que l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* est active sur ces bactéries à Gram positif et à Gram négatif testées. Cette huile s'est révélée plus efficace que la streptomycine, un antibiotique conventionnel utilisée comme contrôle positif dans la même étude, selon ces mêmes auteurs.

Tableau III: Résultat des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des extraits d'*Ocimum basilicum*, d'*Ocimum gratissimum* et des antibiotiques conventionnels testés sur *Salmonella* Legon *Salmonella* Oakland

| Huiles essentielles et antibiotiques conventionnels | CMI (mg/ml) | | CMB (mg/ml) | | CMB/CMI | |
|---|--------------|---------------|---------------|---------------|----------|------------|
| | S. Legon | S. Oakland | S. Legon | S. Oakland | S. Legon | S. Oakland |
| <i>Ocimum basilicum</i> | 36.10^{-3} | 18.10^{-3} | 144.10^{-3} | 72.10^{-3} | 4 | 4 |
| <i>Ocimum gratissimum</i> | 8.10^{-3} | 16.10^{-3} | 16.10^{-3} | 32.10^{-3} | 2 | 2 |
| Gentamycine | 16.10^{-3} | 16.10^{-3} | 16.10^{-3} | 32.10^{-3} | 1 | 2 |
| Tétracycline | 1.10^{-3} | $0,5.10^{-3}$ | 64.10^{-3} | 28.10^{-3} | 64 | 56 |
| Chloramphénicol | 8.10^{-3} | 8.10^{-3} | 128.10^{-3} | 128.10^{-3} | 16 | 16 |
| Fluméquine | 1.10^{-3} | 1.10^{-3} | 2.10^{-3} | 1.10^{-3} | 2 | 1 |
| Thymol | 3.10^{-3} | $1,5.10^{-3}$ | nd | Nd | - | - |

nd = non déterminé

La propriété antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* a été rapportée par Matasyoh *et al.* [24] qui ont réalisé une étude au Kenya sur une huile composée de 68,8 % d'eugénol. Cette étude a montré que l'HE d'*Ocimum gratissimum* est active sur quelques bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*. Au Brésil, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* contre une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et des bactéries à Gram négatif (*Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Proteus mirabilis*), a également été testée par Nakamura *et al.* [9]. Ces auteurs indiquent une CMI plus élevée pour *Staphylococcus aureus* de $0,75 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, contre $3 \cdot 10^{-3}$ à $12 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour les autres bactéries (*Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella* et Protéus). L'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* utilisée par Nakamura *et al.* [9] est plus active que celle obtenue dans le cadre de la présente étude. Ceci pourrait être lié au serotype de la bactérie et aux composés majoritaires des HE obtenus dans chaque cas. Selon Nakamura *et al.* [9], l'eugénol aurait joué un rôle important dans l'activité antibiotique de l'*Ocimum gratissimum*.

Cette forte activité antibactérienne de l'HE d'*Ocimum gratissimum* par rapport à *Ocimum basilicum* est probablement en rapport avec sa teneur élevée en thymol qui est un composé phénolique. L'importance du thymol dans l'activité antibactérienne de l'HE d'*Ocimum gratissimum* a été soulignée par Oussou *et al.* [27] qui ont testé quelques entérobactéries avec l'HE d'*Ocimum gratissimum* brute fractionnée. Ces auteurs ont constaté que la fraction étant constituée majoritairement de composés oxygénés, notamment le thymol, est plus active que les autres fractions. Les valeurs de la CMI du thymol pur contre les deux souches sont de $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour Legon et $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour Oakland. Ceci témoigne de l'activité antibactérienne du thymol contre ces bactéries.

Les valeurs des CMI et CMB des antibiotiques conventionnels testés vis-à-vis des deux sérotypes de *Salmonella enterica* sont récapitulés dans le tableau III. Pour *S. Legon*, la CMI varie de $1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour la tétracycline et la fluméquine à $16 \cdot 10^{-3}$ mg/ml avec la gentamicine, alors que, pour *S. Oakland*, elle varie de $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour la tétracycline à $16 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour la gentamicine. La tétracycline et la fluméquine présentent des valeurs de CMI plus basse que celles de nos huiles essentielles. La valeur de la CMI obtenue pour le

chloramphénicol est identique à celle trouvée pour *Ocimum gratissimum* par rapport à *S. Legon*, mais elle vaut la moitié de celle obtenue par rapport à *S. Oakland*. Ce qui suggère que le chloramphénicol a une activité similaire à celle d'*Ocimum gratissimum* vis-à-vis de *S. Legon*. Par ailleurs, la valeur de la CMI de la gentamicine est la même pour les deux sérotypes, mais elle est aussi égale à celle obtenue avec *Ocimum gratissimum* par rapport à *S. Oakland*. Ce qui suggère que la gentamicine a une activité similaire à celle d'*Ocimum gratissimum* vis-à-vis de *S. Oakland*.

4. Conclusion

Cette étude a montré l'importance de ces deux huiles essentielles du point de vue de leur activité antimicrobienne *in vitro* vis-à-vis de deux souches *Salmonella enterica* sérotypes Legon et Oakland isolés dans des élevages de pintade au Bénin. Ce qui confirme que ces plantes, déjà utilisées par les aviculteurs béninois, possèdent effectivement des propriétés antibiotiques, ce qui suggère que les huiles essentielles des deux plantes pourraient être utilisées dans les traitements des maladies causées par les sérotypes testés.

Les activités antibactériennes de ces deux extraits pourraient être évaluées sur d'autres sérotypes de salmonelles impliqués dans des cas de fièvre typhoïde chez l'homme. Au regard des performances antimicrobiennes de ces deux plantes, d'autres travaux de recherche seront envisagés (tests *in vivo*, isolement des principes actifs dans ces huiles essentielles, etc...).

Enfin, d'une manière générale les différents résultats obtenus constituent une première étape qui ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche de solutions aux problèmes sanitaires de l'élevage traditionnel de la pintade au Bénin.

5. Références

- [1]. Adjanohoun E., Ahyi M.R.A., Akeassi L. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. Agence de coopération culturelle et technique (A.C.C.T.), banque de données PHARMEL 2 (réf. HP 10), 1986, Paris.
- [2]. Adjanohoun E., Adjakidjè V., Ahyi M.R.A. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Bénin. Agence de coopération culturelle et technique (A.C.C.T.), banque de données PHARMEL 2 (réf. HP 10), 1989, Paris.
- [3]. de Larochequet E. La nature au service de la vie. Editions Akademos, 1999, Paris.
- [4]. M. ARBONNIER Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), 2002, Montpellier.

- [5]. Ayedoun M.A., Contribution à la connaissance chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques du Bénin en vue de leur valorisation. Thèse de Doctorat, Université Nationale du Bénin, Cotonou. 1995. 284p.
- [6]. Chopra R.N., Nayar S.L., Chopra I.C.; Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research (1986) New Delhi.
- [7]. Onajobi F.D.; Smooth muscle contracting lipidsoluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*; *J Ethnopharmacol* (1986) 18; 3-11.
- [8]. Begum J., Yusuf M., Chowdhury U., Wahab M.A.; *J. Sci. Ind. Res.*; (1993) 28; 25-34.
- [9]. Nakamura C.V., Nakamura T.U., Bando E., Melo A.F.N., Cortez D.A.G., Dias Filho B.P.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; (1999) 94; 675-678.
- [10]. Ngassoum M.B., Essia-Ngang J.J., Tatsadjien L.N.J., Buchbauer G.; *Fitoterapia*; (2003) 74; 284-7.
- [11]. Adebolu T.T., Oladimeji S.A.; *Afr. J. Biotechnol.* (2005) 4 682-684.
- [12]. Shafique M., Khan S.J., Khan N.H.; *Pharmacologyonline*; (2011) 1; 105-111.
- [13]. Boko C. *E. coli* and *Salmonella* workshop. Thursday 7th June 2007, Utrech, Holland, <https://mail.ulg.ac.be/src/webmail.php>.
- [14]. Akoegninou A. Van der Burg W.J., Van der Maesen L.I.G. Flore Analytique du Bénin, backhuyes Publishers 2006, Cotonou et Wageningen.
- [15]. Noudogbessi J.P. Etudes chimiques et activités biologiques d'extrait végétal aromatisé d'origine Béninoise. Thèse de doctorat unique UAC et Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand ; 2009, 329p;
- [16]. Allegrini J, Simeon de Bouchberg M. *Prod Probl Pharm* ; (1972) 27 ; 891-897
- [17]. Yèhouenou B., Noudogbèssi J.P., Sessou P., Avlessi, F., Sohounhloué, D. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* ; (2010) 029; 19-27.
- [18]. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. *Manuel of clinical microbiology* 6th Edit 1995, ASM, Washington.
- [19]. Yayi E. Contribution à l'étude des huiles essentielles de plantes aromatiques du Bénin : cas de *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; 1998, 182p.
- [20]. Tchoumboungang F., Dongmo P.M.J., Sameza M.L., Mbanjo E.G.N., Fotso G.B.T., Zollo P.H.A., Menut C.; *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*; (2009) 13; 77-84.
- [21]. Sajjadi S. E. DARU, (2006) 14; 128-130.
- [22]. Koba K., Poutouli P.W., Raynaud C., Chaumont J-P. Sandal K.; *Bangladesh J Pharmacol.*; (2009) 4; 1-8.
- [23]. Bassolé I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., Nebié R.C. Dicko M.H.; *Molecules*; (2010) 15; 7825-7839.
- [24]. Matasyoh L.G., Matasyoh J.C., Wachira F.N., Kinyua M.G., Thairu Muigai A.W., Mukiyama Titus K.; *African J. Biotechnol.*; (2007) 6; 760-765.
- [25]. Tatsadjieu N.L., Etoa. F.-X., Mbofung C.M.F., *Tropicultura*; (2008) 26; 78-83.
- [26]. Sahouo G.B., Tonzibo Z.F., Boti B., Chopard C., Mahy J.P., N'guessan Y.T.; *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*; (2003) 17; 191-197.
- [27]. Oussou K. R., Yolou S. F., Tue Bi B., Kanko C., Boti J. B., Ahibo C., J. Casanova. *Eur. J. Sci. Res.* ; (2010) 40 ; 50-59.
- [28]. Cavalcanti E.S.B., de Morais S.M., Lima M.A.A, Santana E.W.P.; *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; (2004) 99; 541-544.
- [29]. Saliu B.K.1, Usman L.A., Sani, A., Muhammad N.O., Akolade J.O; *Int. J. Current Res.*; (2011) 33; 022-028.
- [30]. Joubert T. L, Chambon P, Gattefosse M. ; *Bull. Tech. Gatte*; (1958) 56 ; 7-16.