

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR AGRONOME

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VARIABILITE
QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE L'HUILE
ESSENTIELLE DE RAVENSARA AROMATICA SONNERAT
DANS LA REGION DE BETANIMAINTY

Membres du jury :

- Madame RAONIZAFINIMANANA Béatrice – Président
- Madame ANDRIANOELISOA Hanitra – Membre
- Monsieur COLLAS Philippe – Membre
- Monsieur RAMANOELINA Panja – Tuteur

Présenté par **Falihery Jersin Luc RAOBELISON**

PROMOTION 1998-2003

02 Avril 2004

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR AGRONOME

*CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VARIABILITE
QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE L'HUILE
ESSENTIELLE DE RAVENSARA AROMATICA SONNERAT
DANS LA REGION DE BETANIMAINTY*

Présenté par **Falihery Jersin Luc RAOBELISON**
PROMOTION 1998-2003

02 Avril 2004

REMERCIEMENTS

Au seuil de ce mémoire qui est le fruit de la collaboration entre ESSA – CIRAD FORET – FOFIFA/DRFP, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à :

- Madame **RAONIZAFINIMANANA Béatrice**, Chef du Département Industries Agricoles et Alimentaires de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques qui nous a fait le grand honneur de présider le jury de la présente soutenance.
- Madame **ANDRIANOELISOA Hanitra**, Chercheur au sein du FOFIFA, pour ses conseils techniques et appuis matériels dans la réalisation de cette étude. Qu'elle trouve ici notre profonde reconnaissance.
- Monsieur **COLLAS Philippe**, Chercheur au sein du CIRAD-FORET, pour les directives, aides et conseils qu'il nous a prodigué pendant la réalisation de ce mémoire. Nous lui témoignons nos vifs remerciements.
- Monsieur **RAMANOELINA Panja**, Directeur de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, notre tuteur, pour ses précieuses contributions quant à la réalisation de ce travail, qu'il veuille bien agréer l'expression de notre profonde gratitude.

Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude à :

- Monsieur **DANTHU Pascal**, Chercheur au CIRAD – FORET.
- Monsieur **BEHRA Olivier**, Directeur du Label CBD.
- Mademoiselle **RAKOTOARISON Chantal**, Biochimiste du Label CBD.

Vous avez apporté une part importante dans la réalisation de ce mémoire de fin d'étude. Veuillez trouver ici nos vifs remerciements.

Ce travail n'aurait pu être mené à son terme sans l'aide que nous ont apporté :

- Le personnel du Département IAA
- Le personnel du FOFIFA/DRFP et du CIRAD/ FORET.
- Le groupement « Ravintsaran'i Betanimainty »
- Toute ma famille qui m'a soutenue moralement, matériellement et financièrement
- Nos amis de la Promotion INTSA
- Tous ceux qui, de près et de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

MERCI.

RESUME

Plante endémique de Madagascar découverte et nommée par Sonnerat en 1782, le « Hazomanitra » connu sous le nom scientifique *Ravensara aromatica* Sonnerat s'adapte parfaitement sur le littoral Est. Actuellement, le *Ravensara aromatica* est une des espèces menacées dans la région de Betanimainty à cause de la surexploitation et l'insuffisance de technique de gestion durable, d'où la nécessité de l'utilisation de grimpettes. L'écorce et les feuilles peuvent donner des huiles essentielles qui présentent une composition chimique très différente.

L'étude de la cinétique de distillation par entraînement à la vapeur, du séchage de la matière végétale et des facteurs biologiques et géographiques nous ont permis de classer 2 groupes d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* :

- Groupe I : composé uniquement d'huile légère
- Groupe II : caractérisée par 2 types :
 - Type I : composé uniquement d'huile lourde
 - Type II : si l'huile essentielle présente simultanément une fraction légère et lourde.

Le rendement en huile essentielle (en v/p) diminue en fonction de la durée de distillation. Pendant 4 heures d'extraction, il passe de 0,63 à 0,01 % pour l'huile du groupe I et de 0,42 à 0,02% pour celle du groupe II. Pour l'huile essentielle de type II, la teneur en huile légère est largement faible par rapport à celle en huile lourde. Après séchage de 24 heures de la matière végétale, le rendement augmente de 0,50 à 0,98% pour le type I et de 0,59 à 0,75% pour le type II. La teneur en huile lourde augmente de 0,43 à 0,70% après séchage tandis que celle en huile légère décroît de 0,17 à 0,07%.

Pour les caractéristiques physico-chimiques, la densité augmente au cours de l'extraction. Elle passe de 0,8768 à 0,8963 pour le groupe I et de 1,0007 à 1,0132 pour l'huile du groupe II. De même, l'indice de réfraction s'accroît durant l'extraction : il augmente de 1,4775 – 1,4905 durant 4 heures pour le groupe I ; de 1,5181 – 1,5248 pour la fraction légère du groupe II et de 1,5196 – 1,5258 pour la fraction lourde du groupe II.

Le séchage de la matière végétale de 24 heures avant la distillation entraîne une augmentation du rendement en huile essentielle du groupe II (0,5 à 0,98% pour le type I et 0,59 à 0,75% pour le type II) et réduit le temps d'extraction jusqu'à trois heures.

La composition chimique varie peu avec le séchage. Le méthyl eugénol reste le majeur constituant.

Il existe deux chemotypes de *Ravensara aromatica* dans la forêt de Betanimainty :

- Groupe I riche en sabinène et autres hydrocarbures terpéniques
- Groupe II riche en méthyl eugénol.

Il est important de récupérer les résidus d'huile retenue dans l'eau florale par décantation prolongée ou par cohobation car l'huile essentielle, surtout celle du groupe II, est riche en produits polaires qui sont très solubles dans l'eau.

Mots-clés : *Ravensara aromatica* – Huiles essentielles – huile légère – Huile lourde – cinétique de distillation – Séchage des feuilles – Chemotypes.

LISTE DES ABREVIATIONS

Alt:	Altitude
Ahu :	α humulène
Ate :	α terpinène
Api :	α pinène
Bca :	β caryophyllène
Bpi :	β pinène
Cam :	Camphène
Cin+bph :	1,8-cinéole + β phellandrène
CBD :	Conservation and BioDiversity
CPG:	Chromatographie en Phase Gazeuse
CIREF :	Centre Inter-Régional des Eaux et Forêts
CITE :	Centre d'Information Technique et Environnementale
D3c :	δ^3 carène
ESSA:	Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques
FOFIFA :	FOibe Fikarohana momba ny FAmbolena
Ger :	Germacrène D
Gr :	Groupe
HI :	Huile légère
HL :	Huile Lourde
Hau :	Hauteur de l'arbre
IMRA:	Institut Malgache des Recherches Appliquées
Lim :	Limonène
Lin :	Linalol
Map :	Myrcène + α phellandrène
MATE:	Man And The Environnement
Max :	Maximum
Mch :	Méthyl chavicol
Meu :	Méthyl eugénol
Min :	Minimum
MONO :	Monoterpènes
Oci :	Ocimène
Pcy :	p cymène
POX :	Produits oxygénés
Rdt :	Rendement
Sab :	Sabinène
SES :	Sesquiterpènes
Ter :	Terpinène
Tol :	Terpinène 4ol
Yter :	γ Terpinène

LEXIQUE

Aromathérapie :	Soins par les huiles essentielles végétales
Alterne :	Disposé de chaque côté mais non en face les unes des autres
Chémotypes :	Plantes d'une même espèce végétale donnant des huiles essentielles de compositions différentes
Coriace :	Dur comme du cuir
Crevasse :	Fente à la surface d'un corps
Distillation fractionnée :	Les fractions de distillats sont recueillies en fonction du temps
Epars :	Répandu çà et là
Glabres :	Dépourvu de poils
Glaucous :	Tirant vert sur le bleu
Hydrolat :	L'eau, qui a servi dans la distillation, à entraîner l'huile essentielle puis qui est séparée, après condensation, de l'huile elle-même
Terne :	Manque d'éclat

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE ET GENERALITES SUR LE RAVENSARA AROMATICA ET SES HUILES ESSENTIELLES	2
I.1. Présentation de la zone d'étude :.....	2
1.1. Localisation du site :.....	2
1.1.1. Situation administrative :.....	2
1.1.2. Situation géographique:.....	2
1.1.3. Topographie :.....	2
1.2. Milieu climatique :.....	4
1.2.1. Pluviométrie :.....	4
1.2.2. Température :.....	5
1.2.3. Diagramme ombrothermique :.....	5
1.2.4. Climat de la région :.....	6
1.3. Milieu biologique :.....	6
1.3.1. Végétation :.....	6
1.3.2. Faune :.....	6
1.3.3. Flore :.....	6
1.4. Milieu humain :.....	7
1.4.1. Population de Betanimainty :.....	7
1.4.2. Groupement de Betanimainty :.....	7
1.5. Milieu économique :.....	8
1.5.1. Agriculture :.....	8
1.5.2. Elevage :.....	8
I.2. Généralités sur la plante:.....	8
2.1 Origine et historique :.....	8
2.2. Biosystematique :.....	8
2.3. Morphologie :.....	9
2.3.1. Feuilles :.....	9
2.3.2. Tiges et rameaux :.....	9
2.3.3. Ecorces :.....	9
2.3.4. Fleurs et fruits :.....	9
2.4. Localisation de l'huile essentielle :.....	10

2.5.	Etudes écologiques et ennemis de la plante :	11
2.5.1.	Exigences écologiques :	11
2.5.2.	Ennemis de la plante :	11
2.6.	Répartition géographique et utilisation traditionnelle :	11
I.3.	Généralités sur les huiles essentielles et la distillation :	11
3.1.	Les huiles essentielles :	11
3.1.1.	Définitions :	11
3.1.2.	Huile essentielle et normes :	12
3.1.3.	Points forts :	12
3.1.4.	Points sensibles :	12
3.2.	La distillation à la vapeur :	12
3.2.1.	Définition :	12
3.2.2.	Principe :	12
I.4.	Synthèse des travaux antérieurs sur l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> :..	13
4.1.	Rendement en huile essentielle:	13
4.2.	Caractéristiques physico-chimiques :	13
4.3.	Composition chimique :	14
	CONCLUSION PARTIELLE I.....	16

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODOLOGIE DE TRAVAIL..... 17

II.1.	Matériels :	17
2.1.1.	Matériel végétal :	17
2.1.2.	Matériel de collecte :	17
2.1.3.	Matériels et techniques d'extraction d'huile essentielle :	18
2.1.3.1.	Alambics :	18
2.1.3.2.	Matériel et technique de décantation :	20
2.1.4.	Matériels et technique d'analyse au laboratoire :	20
2.1.4.1.	Matériel et technique densimétrique :	20
2.1.4.2.	Matériel et technique de détermination de l'indice de réfraction :	21
2.1.4.3.	Matériel et technique chromatographique :	21

II.2. Méthodologie de travail :.....	23
2.2.1. Schéma récapitulatif de la méthodologie de travail :	23
2.2.2. Méthode de collecte des données :	23
2.2.2.1. Bibliographie :	23
2.2.2.2. Descente sur terrain :	24
2.2.2.3. Analyse et traitement des données :	25
2.2.2.4. Limites de l'étude :	26
CONCLUSION PARTIELLE II	27
PARTIE3 : ETUDE ANALYTIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>Ravensara</i>	
<i>aromatica</i>	28
III.1. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'huile essentielle de <i>Ravensara</i>	
<i>aromatica</i> :	28
3.1.1. Rendement :.....	28
3.1.2. Qualité organoleptique :	28
3.1.3. Composition chimique :	28
3.1.4. Propriétés microbiologiques :.....	28
III.2. Variation de la cinétique de distillation :.....	29
3.2.1. Aspects physiques :	29
3.2.2. Teneur en huile essentielle :	30
3.2.3. Caractéristiques physico-chimiques :	31
3.2.4. Composition chimique :	32
3.2.4.1. Hydrocarbures terpéniques :.....	33
3.2.4.2. Produits oxygénés :	34
III.3. Variation de l'huile essentielle	
suivant la durée de séchage de la matière première:	41
3.3.1. Traitement de la matière végétale :	41
3.3.2. Aspects physiques :	41
3.3.3. Teneur en huile essentielle :	42
3.3.4. Composition chimique :	44
3.3.4.1. Hydrocarbures terpéniques :.....	45
3.3.4.2. Produits oxygénés :	46

III.4. Etude de la variabilité individuelle de <i>Ravensara aromatica</i> et détermination des facteurs influençant la quantité et la qualité de l'huile essentielle :	49
3.4.1. Aspects physiques :	49
3.4.2. Teneur en huile essentielle :	49
3.4.3. Composition chimique :	50
3.4.3.1. Population I :	51
3.4.3.2. Population II :	52
III.5. Recommandations	58
3.5.1. Matériel de collecte :	58
3.5.1.1. Avantages :	58
3.5.1.2. Inconvénients et limite :	58
3.5.2. Récupération des huiles essentielles :	58
3.5.2.1. Décantation prolongée :	58
3.5.2.2. Cohobation :	58
3.5.3. Conditionnement et stockage :	58
CONCLUSION PARTIELLE III	59
CONCLUSION GENERALE	60
BIBLIOGRAPHIE	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Situation administrative de la zone d'étude.....	2
Tableau 2: Comparaison du rendement (v/p) en huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i>	13
Tableau 3: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> à partir des feuilles.	13
Tableau 4 : Composition chimique de l'huile essentielle de l'écorce de <i>Ravensara</i> <i>aromatica</i>	14
Tableau 5: Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de <i>Ravensara aromatica</i>	14
Tableau 6 : Cycle de production.....	19
Tableau 7 : Effectif des échantillons d'huile essentielle	24
Tableau 8: Aspects physiques de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> du groupe I.....	29
Tableau 9: Aspects physiques de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> du groupe II	29
Tableau 10 : Evolution du rendement d'extraction suivant la durée de distillation (%).....	30
Tableau 11 : Comparaison du rendement d'extraction d'huile essentielle du groupe II (%)	30
Tableau 12: Constantes physico-chimiques des huiles essentielles de <i>Ravensara aromatica</i> selon la cinétique de distillation.	31
Tableau 13: Valeur moyenne des constantes physico-chimiques	31
Tableau 14: Constituants des hydrocarbures terpéniques de l'huile du groupe I suivant l'heure d'extraction. (%).....	33
Tableau 15 : Constituants des hydrocarbures terpéniques de l'huile du groupe II suivant la durée d'extraction. (%)	34
Tableau 16 : Constituants majeurs des hydrocarbures terpéniques des huiles du groupe II.....	34
Tableau 17: Constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de du groupe I. (%)	34
Tableau 18: Constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de <i>Ravensara</i> <i>aromatica</i> du groupe II. (%)	35
Tableau 19: Constituants majeurs de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> en fonction de la durée d'extraction (%).	37
Tableau 20: Evolution de l'humidité des feuilles au cours du séchage.....	41
Tableau 21 : Variation du rendement en huile essentielle en (V/P) suivant la durée de séchage.....	42

Tableau 22: Comparaison du rendement (v/p) cumulé des huiles essentielles à partir des feuilles séchées (%).	43
Tableau 23 : Comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle du groupe II en fonction du temps de séchage. (%)	44
Tableau 24: Comparaison de la fraction des hydrocarbures terpéniques de l'huile essentielle du groupe II en fonction de la durée de séchage des feuilles. (%)	45
Tableau 25 : Constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle du groupe II. (%)... 46	
Tableau 26 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>Ravensara aromatica</i> suivant la durée de séchage. (%)	46
Tableau 27: Caractéristiques des 6 arbres	49
Tableau 28: Aspects physiques de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i>	49
Tableau 29 : Rendement en huile essentielle des 6 arbres	49
Tableau 30: Composition chimique des deux groupes d'huiles essentielles (%).	51
Tableau 31: Comparaison de la fraction des hydrocarbures terpéniques sur les arbres 2, 3, 4 (%)	51
Tableau 32: Comparaison de la fraction des produits oxygénés sur les arbres 2, 3 et 4 (%). 52	
Tableau 33: Comparaison de la fraction des hydrocarbures terpéniques sur les arbres 1, 5 et 6 (%).	52
Tableau 34: Comparaison de la fraction des produits oxygénés sur les arbres 1, 5 et 6 (%).	53
Tableau 35: Comparaison des deux populations de <i>Ravensara aromatica</i>	53
Tableau 36 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> venant de 6 arbres différents (%).	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Courbe de la pluviométrie moyenne.....	4
Figure 2 : Nombre de jours de pluie annuel.....	4
Figure 3: Courbe annuelle de la température.....	5
Figure 4 : Courbe ombrothermique de la région de Moramanga.....	5
Figure 5: Evolution du rendement en huiles légères et en huiles lourdes du groupe II.....	30
Figure 6: Evolution de la densité de l'huile essentielle suivant la durée d'extraction.....	31
Figure 7: Evolution de la composition chimique (%) de l'huile essentielle suivant la durée d'extraction.....	32
Figure 8: Evolution des constituants chimiques de l'huile du groupe I durant l'extraction...	35
Figure 9 : Evolution des constituants chimiques de l'huile légère du groupe II durant l'extraction.....	36
Figure 10: Evolution des constituants chimiques de l'huile lourde du groupe II durant l'extraction.....	36
Figure 11: Chromatogramme de l'huile essentielle du groupe I à la première heure.....	38
Figure 12: Chromatogramme de l'huile essentielle du groupe I à la quatrième heure.....	38
Figure 13: Chromatogramme de l'huile légère du groupe II à la première heure.....	39
Figure 14: Chromatogramme de l'huile légère du groupe II à la quatrième heure.....	39
Figure 15: Chromatogramme de l'huile lourde du groupe II à la première heure.....	40
Figure 16: Chromatogramme de l'huile lourde du groupe II à la quatrième heure.....	40
Figure 17 : Variation du rendement par rapport au poids frais en huile essentielle de type I et II en fonction de la durée de séchage.....	42
Figure 18: Evolution du rendement par heure en fonction de la durée de séchage.....	43
Figure 19: Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du groupe II en fonction du temps de séchage.....	44
Figure 20: Chromatogramme de l'huile essentielle de type I extraite à partir des feuilles fraîches.....	47
Figure 21 : Chromatogramme de l'huile essentielle de type I extraite à partir des feuilles séchées pendant 24 heures.....	47
Figure 22: Chromatogramme de l'huile essentielle de type II extraite à partir des feuilles séchées pendant 24 heures.....	48
Figure 23: Chromatogramme de l'huile essentielle de type II extraite à partir des feuilles séchées pendant 48 heures.....	48

Figure 24: Composition chimique des 6 échantillons obtenus sur les 6 arbres.....	50
Figure 25: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> recueillie sur l'arbre 1.....	55
Figure 26 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> recueillie sur l'arbre 2.....	55
Figure 27: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> recueillie sur l'arbre 3.....	56
Figure 28: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> recueillie sur l'arbre 4.....	56
Figure 29 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> recueillie sur l'arbre 5.....	57
Figure 30 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> recueillie sur l'arbre 6.....	57

LISTE DES SCHEMAS ET PHOTOS

Schéma 1: Organisation du groupement « ravintsaran'i Betanimainty	7
Schéma 2: Principe simplifié d'un chromatographe pour CPG	22
Schéma 3: Récapitulation de la méthodologie de travail	23
Photo 1: Un arbre de <i>Ravensara aromatica</i>	9
Photo 2: <i>Ravensara aromatica</i> avant récolte.....	18
Photo 3: <i>Ravensara aromatica</i> après récolte.....	18
Photo 4: Cueillette des feuilles avec petits rameaux	20
Photo 5: Récupération des huiles essentielles	20

LISTE DES ANNEXES

Annexe I: Protocole de distillation	i
Annexe II: Protocole de détermination du poids sec des feuilles.....	iii
Annexe III: Protocole de lavage de l'alambic.....	iv
Annexe IV: Fiche de collecte	v
Annexe V: Fiche de distillation	vi
Annexe VI: Règles générales d'étiquetage et de marquage des récipients	vii
Annexe VII: Règles de dénomination	ix

INTRODUCTION

Du fait de sa diversité en faune et en flore, Madagascar était connu sous le nom de l'île verte. Cependant, à cause de l'action de la population, cette richesse en ressources naturelles est menacée par la surexploitation et la dégradation rapide et cela se traduit par la diminution des surfaces forestières et la disparition de certaines espèces.

La loi forestière adoptée le 02 octobre 1997 du décret n°97-1200 définissait la politique forestière :

- Conserver les ressources forestières par une gestion durable appropriée
- Responsabiliser les acteurs locaux à la gestion des ressources forestières

Ainsi, le *Ravensara aromatica* Sonnerat mentionné selon le proverbe « *sakamalaho sy havozo, samy manana ny hanitra ho azy* » était abondant dans le côte Est de Madagascar mais actuellement il fait partie des espèces menacées et nécessite d'être mis sous contrôle. Ainsi, le « groupement de Betanimainty », producteur d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* essaie de trouver les moyens et techniques de conservation de cette plante.

Cette fameuse plante aromatique qui était victime d'une confusion d'origine ethnique par son appellation et d'origine botanique peut donner une huile essentielle décrite par Baumé. En effet, la plante et surtout son huile essentielle possèdent des propriétés bien exploitables et intéressantes. Ce qui nous a conduit à étudier la variation qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* afin de donner un guide pour l'établissement d'avant-projets de normes et à plus long terme de normes jusqu'à présent inexistantes. Il s'agit spécifiquement d'évaluer les fluctuations de la composition chimique et les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle, de mettre en relation ces paramètres avec les critères relevés sur terrain et d'étudier les différents types de l'huile essentielle.

Cet ouvrage est divisé en 4 grandes parties :

- La présentation de la zone d'étude ainsi que des généralités sur la plante et ses huiles essentielles,
- Les matériels et la méthodologie de travail,
- L'étude analytique de l'huile essentielle mettant en valeur la variation des caractéristiques physico-chimiques et de la composition chimique en fonction de la durée d'extraction, de la durée de séchage et d'étudier la variabilité inter arbre.
- Les recommandations sur les techniques d'extraction pour la suite du travail.

PARTIE 1 : PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE ET GENERALITES SUR LE RAVENSARA AROMATICA ET SES HUILES ESSENTIELLES

I.1. Présentation de la zone d'étude :

1.1. Localisation du site :

1.1.1. Situation administrative :

La zone d'étude se situe près du village de Betanimainty où est installé l'alambic et dans la forêt de Betanimainty.

Tableau 1 : Situation administrative de la zone d'étude

Province	Tamatave
Sous-préfecture	Moramanga
Commune rurale	Ampasipotsy
Fokontany	Amparafara
Village	Betanimainty
Forêt	Betanimainty

1.1.2. Situation géographique:

Le village de Betanimainty est situé à l'Ouest du Fokontany d'Amparafara, qui se trouve à 21 Km de Moramanga sur la route nationale n°2 reliant Tananarive et Tamatave.

Géographiquement, cette zone d'étude est comprise entre la latitude 18°59,5'et 19°05' Sud et la longitude 48°22'5 et 48°28 Est. Elle est située sur le premier des deux escarpements qui séparent le plateau central des basses terres de la côte orientale.

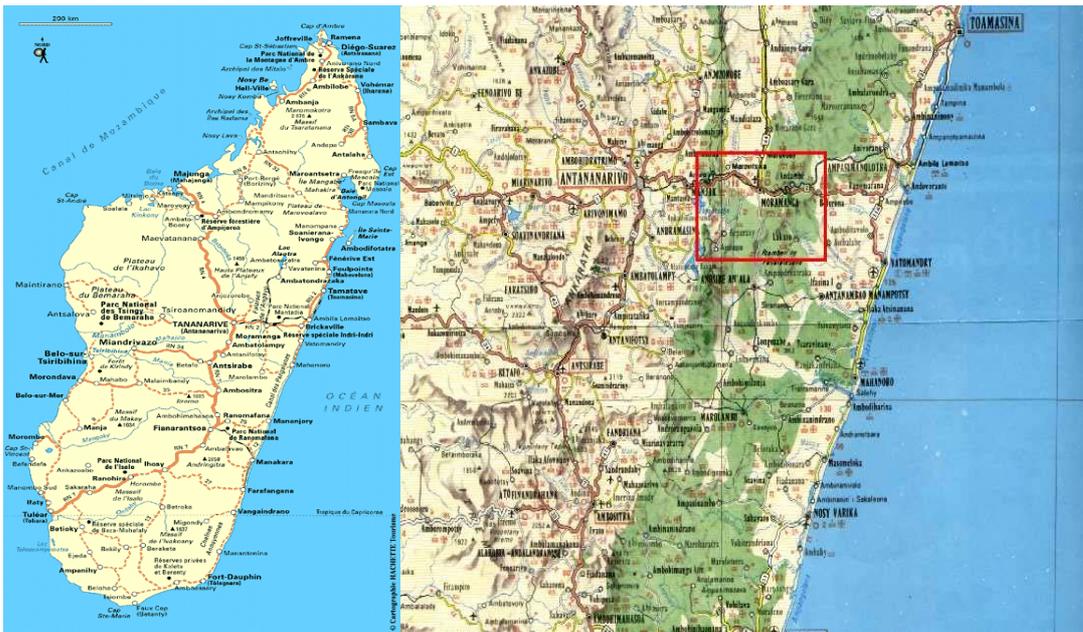
1.1.3. Topographie :

La topographie de la région de Betanimainty est caractérisée par des reliefs très accidentés à pentes raides ayant une valeur moyenne de 40% mais qui dépassent parfois les 60%.

L'altitude passe de 850 à 1250 m, ce qui confirme la raideur des pentes.

Les formes du relief paraissent fonction de l'importance de la dénivellation. Pour une faible dénivellation, les sommets des collines apparaissent arrondis et les bas fonds élargis tandis que pour une forte dénivellation, les sommets sont sous forme d'arête, les bas-fonds étroits et les côtes longues et raides.

Le *Ravensara aromatica* pousse à l'état sauvage sur la côte Est de Madagascar, une zone où les conditions écologiques sont favorables à son développement.

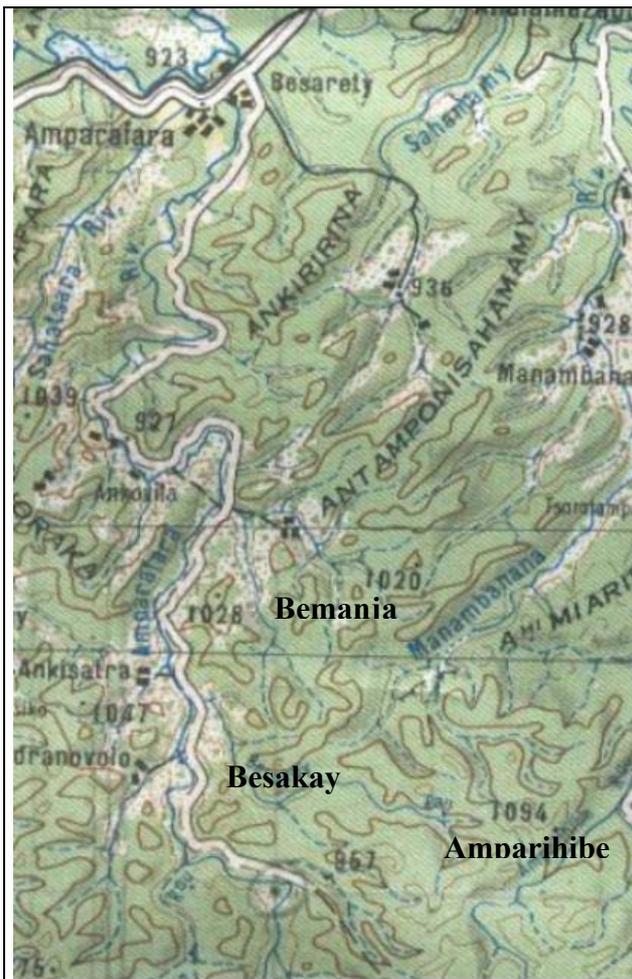


Madagascar

Moramanga à l'Est de Tananarive

Source : FTM 1990

Echelle : 1/200.000



- Zone 1 : Besakay
- Zone 2 : Bemanja
- Zone 3 : Amparihibe

Source : FTM
Echelle : 1/100.000

Carte 1 : Localisation de la zone d'étude

1.2. Milieu climatique :

1.2.1. Pluviométrie :

Les pluies sont abondantes et bien réparties toute l'année. Ceci est dû à la présence de l'alizé, vent du secteur Est, générateur de pluies quasi-permanentes et qui frappe perpendiculaire et régulièrement pendant toute l'année le domaine oriental.

Les mois les plus arrosés se situent au cours des trois premiers mois et du dernier mois de l'année avec 185 à 225 mm/mois. Cette saison est marquée par la fréquence des orages et des cyclones qui traversent la zone surtout au mois de février. La quantité de pluies diminue du mois d'avril en octobre. Cette saison est caractérisée par la présence de brouillards matinaux permanents et des crachins presque journaliers. La plus faible quantité de pluies s'observe au mois d'octobre avec 9 mm.

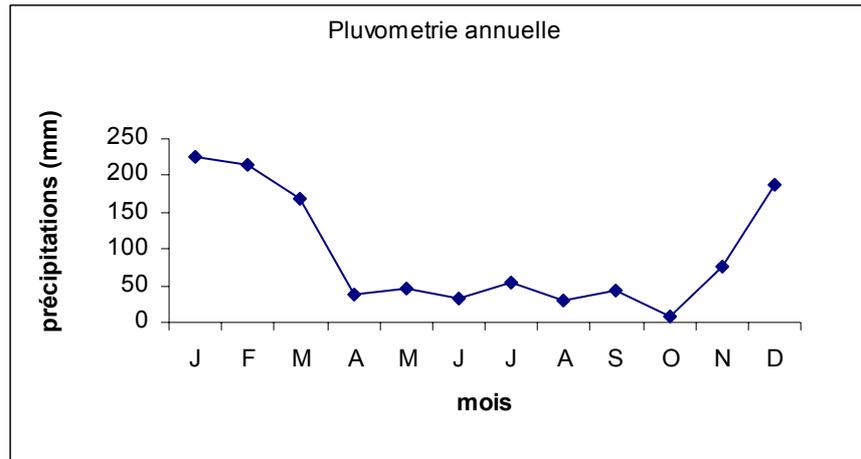


Figure 1 : Courbe de la pluviométrie moyenne.

Source : Station météorologique. Période 1996-2000

Les pluies sont régulièrement réparties toute l'année et il n'y a pratiquement pas de saison sèche. Il pleut en moyenne 143 jours sur 365.

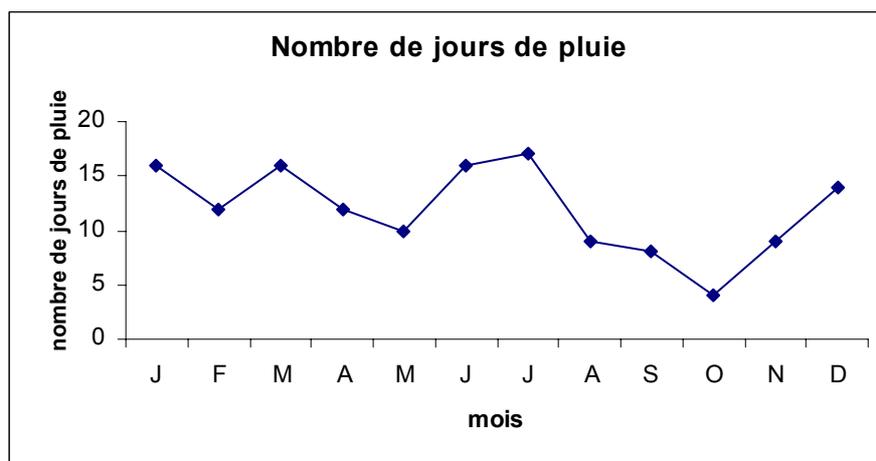


Figure 2 : Nombre de jours de pluie annuel.

Source : Station météorologique. Période 1996-2000

1.2.2. Température :

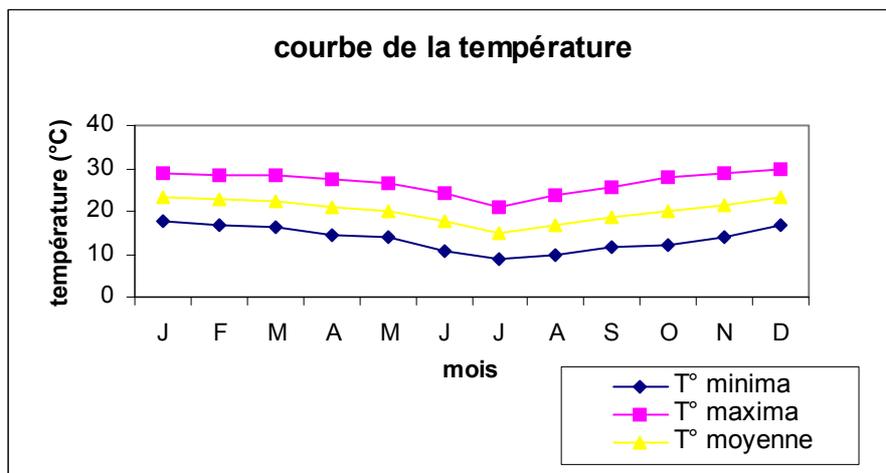


Figure 3: Courbe annuelle de la température
Source : Station météorologique. Période 1996-2000

La température moyenne annuelle atteint les 20,8°C. La température la plus élevée se situe le plus souvent en janvier tandis que juillet demeure le mois le plus froid.

1.2.3. Diagramme ombrothermique :

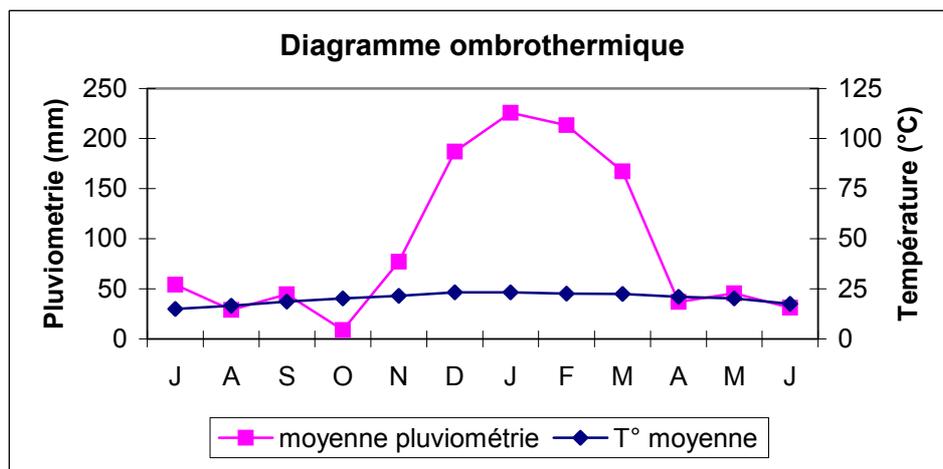


Figure 4 : Courbe ombrothermique de la région de Moramanga
Source: Station météorologique. Période 1996-2000

On peut déduire que :

- Il y a 6 mois écologiquement secs d'avril en octobre.
- La saison de pluies dure de novembre en avril au cours de laquelle il y a des averses brutales érosives des pluies cycloniques.

La courbe ombrothermique de GAUSSEN montre que la région concernée est humide et il n'y a pratiquement pas de saison sèche.

1.2.4. Climat de la région :

Le versant oriental est caractérisé par l'abondance des précipitations annuelles et l'absence de véritable saison sèche. Le climat est essentiellement de type tropical humide et déterminé par l'alizé.

1.3. Milieu biologique :

1.3.1. Végétation :

On rencontre 2 types de végétation dans la forêt de Betanimainty qui fait partie de la forêt dense humide.

- La forêt primaire : cette forêt de série à Tambourissa et à Weinmannia possède 3 strates dont une strate supérieure à plus de 20 m de hauteur, une strate intermédiaire constituée par des arbres ayant une hauteur de 10 à 15m et une strate inférieure d'arbres et arbustes de 5m.
Des espèces de la forêt dense humide sempervirente de l'Est telles que : *Tambourissa* (ambora), *Ocotea* (varongy), *Cryptocaria* (tavolo), *Dalbergia* (voamboana),...
- Le savoka ou kapoka : c'est la forêt secondaire après défrichement constituée principalement par de *Psidia altissima*, *Lantana camara*, *Trema orientalis*, *Harungana madagascariensis*. Toutefois, on peut y rencontrer des îlots de forêt primitive.

1.3.2. Faune :

La faune y est exceptionnellement riche et l'on rencontre de nombreuses représentations des grands groupes.

- Les mammifères sont nombreux avec beaucoup d'espèces endémiques :
 - Les carnivores tels que le lambo
 - Les lémurienens tels que *Indri Indri*, *Propithecus diadema*, *Avahi laniger* (fotsifehy), *Varecia variegata variegata*, *Eulemur fulvus albifrons*.
 - Des petits vertébrés mammifères tels que *Cryptoprocta ferox* (fosa)
 - Des reptiles comme : *Chalarodor madagascariensis*
 - Des insectes de l'ordre de Coléptère,.....
- Les oiseaux sont bien représentés ; on y a remarqué :
 - *Lophotibis cristala*,
 - *Asio madagascariensis*

1.3.3. Flore :

La région est marquée par la grande diversité de la flore. Parmi les arbres et arbustes, on note la présence des familles suivantes :

- Famille LAURACEAE :
- Famille DILLENIACEAE :
- Famille MONIMICEAE :
- Famille ASTERACEAE
- Famille EUPHORBIACEAE :
- Famille EURYTHROXYLACEAE
- Famille VERBENACEAE :
- Famille MYRTACEAE :
- Famille CUNONIACEAE :
- Famille SAPOTACEAE :
- Famille RUTACEAE :
- Famille LAMIACEAE:
- Famille OLEACEAE :

Les espèces fruitières sont bien représentées :

- Famille MUSACEAE : akondro
- Famille MYRTACEAE : rotra fotsy

La plante médicinale la plus fréquemment utilisée est le *Ravensara aromatica*

On peut conclure que la richesse de la flore et de la faune est exceptionnelle dans cette forêt de Betanimainty. Malheureusement, cette biodiversité est en danger si le rythme actuel de la destruction continue.

1.4. Milieu humain :

1.4.1. Population de Betanimainty :

La population de Betanimainty compte 224 individus au dernier recensement. La population active ne représente que 27.6% seulement. Les Betsimisaraka constituent la totalité de la population.

1.4.2. Groupement de Betanimainty :

Les paysans de Betanimainty se sont associés pour former un groupement connu sous le nom de « ravintsaran'i Betanimainty ». Cette association fût créée en 2001 par le projet MATE (Man And The Environnement) dont l'objectif est la contribution prometteuse au développement de la politique nationale en matière de conservation de l'environnement. (16)

L'effectif du groupement s'élève à 32 comprenant 18 hommes et 14 femmes.

La principale activité de ce groupement est de produire des huiles essentielles à partir de quelques plantes telles que le, dingadingana, radiaka,...et surtout le *Ravensara aromatica* dont le marché est réservé au Label CBD.

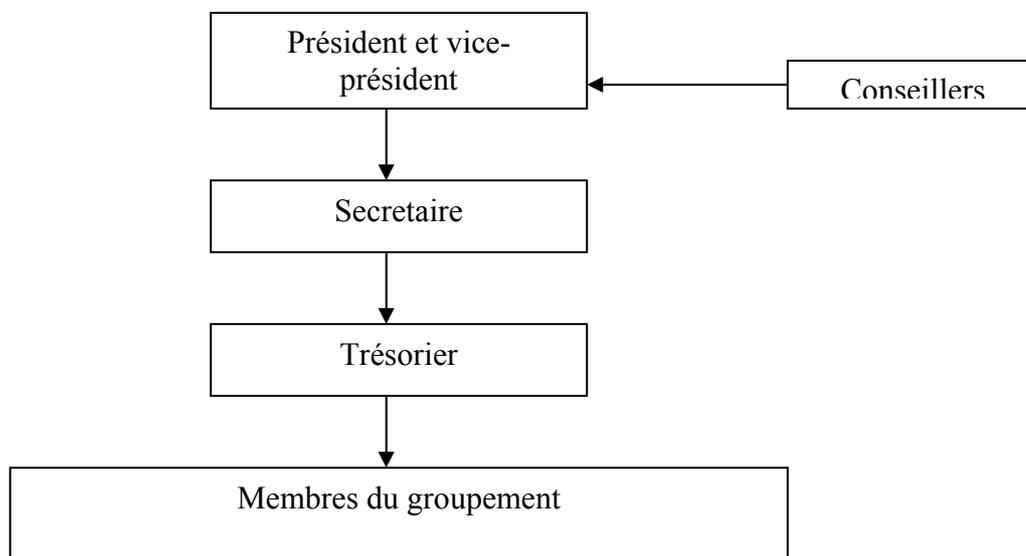


Schéma 1: Organisation du groupement « Ravintsaran'i Betanimainty »

1.5. Milieu économique :

1.5.1. Agriculture :

Concernant la production agricole, on y rencontre des cultures vivrières. Ce sont le riz, le manioc, le maïs, la patate douce, le haricot, le taro. Ces cultures sont effectuées par le système de brûlis qui domine encore dans la région.

En effet, la production n'arrive pas à couvrir le besoin alimentaire annuel du ménage. Ce qui nécessite l'achat des produits sur 9 mois d'une année.

1.5.2. Elevage :

L'élevage n'a pas trouvé sa véritable importance dans les activités productives des paysans de Betanimainty. L'alimentation est très simple et les animaux n'ont pas de logement approprié.

L'élevage bovin est de type extensif et de faible productivité.

L'élevage avicole de type familial et traditionnel est peu répandu dans le village. La cause est l'attaque fréquente des maladies surtout le « barika » et la présence des prédateurs tels que le *Cryptoprocta ferox*.

L'élevage ne constitue donc pas de sources de revenu pour le ménage mais destiné à la consommation locale lors des fêtes.

I.2. Généralités sur la plante:

2.1 Origine et historique :

Flacourt en 1564 avait signalé cette extraordinaire plante aromatique reconnue traditionnellement tonique et antivirale puissante qui donnait par distillation une huile essentielle décrite par Baumé en 1775.

Le *Ravensara aromatica* fut découverte et nommée par Sonnerat en 1782. La patrie d'origine est Madagascar mais il y est appelé sous différentes appellations :havozo, avozo, hazomanitra, tavoloaly, ravintsara, voaravintsara

En 1950, une espèce de *Ravensara anisata* a été décrite par Danguy comme variété à cause de son odeur anisée. En fait, le *Ravensara aromatica* et le *Ravensara anisata* sont techniquement les mêmes variétés mais les organes producteurs d'huile essentielle sont différents.

Ainsi, la confusion qui est en relation avec l'expression malgache a été clarifiée par des études récentes selon la proposition suivante :

- Ravintsara est l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora* composée majoritairement par le cinéole de Madagascar.
- *Ravensara aromatica* est l'huile essentielle des feuilles de *Ravensara aromatica* Sonnerat.
- Havozo est l'huile essentielle de l'écorce de *Ravensara aromatica* (7)

2.2. Biosystematique :

Botaniquement, le *Ravensara aromatica* est classé comme suit :

- Règne : **VEGETAL**
- Sous-règne : **METAPHYTE**
- Embranchement : **SPERMAPHYTE**
- Sous-embranchement : **ANGIOSPERME**
- Classe : **DICOTYLEDONES**
- Ordre : **LAURALES**
- Famille : **LAURACEAE**
- Genre : **RAVENSARA**
- Espèce : **AROMATICA**

2.3. Morphologie :

Il s'agit d'un arbre de 12 à 20 m de haut, à ramille subcylindrique, striés en long, lisse, glabre, un peu anguleux et garnis de très petits épars vers le sommet. (4)

2.3.1. Feuilles :

Elles sont glabres, coriaces ou rigides-coriaces, alternes, elliptiques ou obovales-elliptiques, à base aiguë et à sommet saillant ou non saillant. La face supérieure des feuilles est verte, brillante et la face inférieure est terne, glauque.

En effet, la couleur et la taille des feuilles varient suivant la position topographique de la plante. Elles sont de couleur verte claire et de petite taille sur les hauts-versants et plus foncées, de grande taille sur les mi-versants.

2.3.2. Tiges et rameaux :

Ils sont glabres, cylindriques, lisses, à grandes lenticelles elliptiques avec des bourgeons garnis de très petits poils, jaunâtres.

2.3.3. Ecorces :

L'écorce grisâtre à une épaisseur de 6 à 8 mm, finement crevassée en long, dégage une odeur pénétrante d'anis.

2.3.4. Fleurs et fruits :

Les fleurs de couleur vertes, companulées-urcéolées, à peine poilues de 2 à 3.5 mm comportant un tube glabre en dedans brusquement élargi en périanthe, à tépales sub-égaux, dressés étalés, à sommet incurvé, un peu concaves, elliptiques, longs de 2mm environ, à base poilue en dedans.

Les fruits sub-globuleux, ayant un diamètre maximal de 2.5 cm, sont assez lisses, à 6 côtes obscures, apiculés, à base un peu aplatie.



Photo 1 : Un arbre de *Ravensara aromatica Sonnerat*

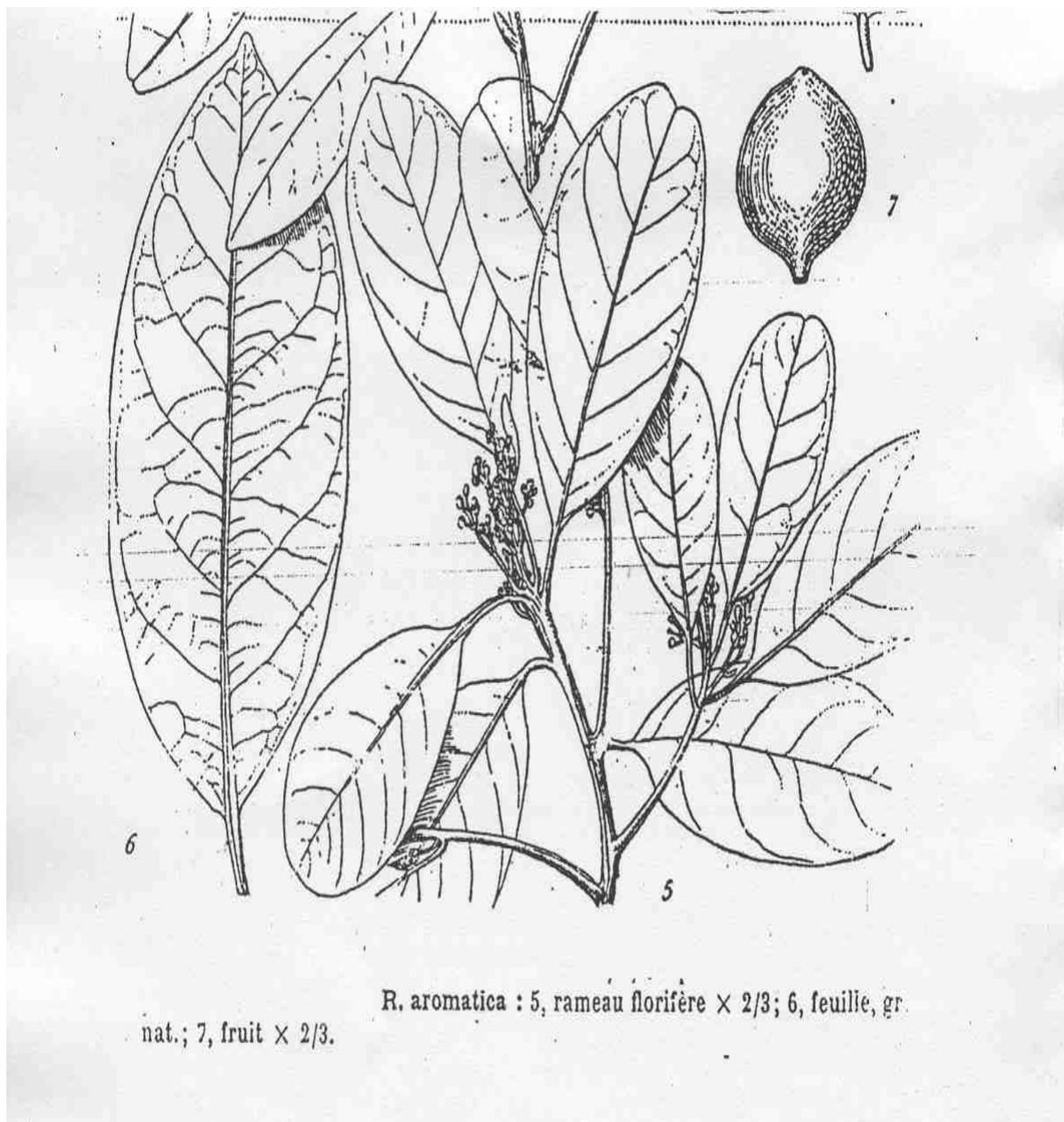
2.4. Localisation de l'huile essentielle :

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement fonction de la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante.

Dans les feuilles de *Ravensara aromatica*, ce sont les cellules placées dans le parenchyme palissadique qui contiennent l'essence.

D'autre part, on peut extraire des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* à partir des écorces. Selon la partie distillée, les résultats sont très différents du point de vue composition chimique.

Il convient donc, outre le nom exact de l'huile, de savoir quelle partie de la plante a été utilisée. Ce qui est une obligation pour les producteurs selon la norme française NF T 75-002 régissant les règles générales d'étiquetage et de marquage des récipients car c'est à partir de cette information complémentaire que le praticien aromatalogue choisira à bon escient.



R. aromatica : 5, rameau florifère $\times 2/3$; 6, feuille, gr.
nat.; 7, fruit $\times 2/3$.

Source : KOSTERMANS (4)

2.5. Etudes écologiques et ennemis de la plante :

2.5.1. Exigences écologiques :

- La plante pousse sur le versant à une altitude de 700 à 1000m et peu répandue vers 950 m.(4)
- Elle s'adapte dans des régions où la pluviométrie moyenne annuelle est de 1600 mm environ et la température moyenne annuelle est comprise entre 18°C et 24°C.
- Le facteur lumière joue un rôle important du fait que la plante est héliophile, elle exige donc un fort ensoleillement toute l'année pour que son développement et sa croissance puissent se dérouler normalement.

2.5.2. Ennemis de la plante :

L'attaque des insectes et des maladies surtout sur des rejets sont souvent fréquentes. Elle a pour effet de ralentir voire arrêter leur croissance.

Pendant la période de fructification, les fruits bien appréciés par les lémuriers sont attaqués.

Sur une zone où on rencontre des populations de voapaka, aucun pied de Ravensara ne pousse dans les environs.

2.6. Répartition géographique et utilisation traditionnelle :

Le *Ravensara aromatica* est abondant dans la forêt primaire de l'Est ainsi qu'occasionnellement dans les forêts de côte Est malgré la surexploitation dont il a été victime.

L'utilisation traditionnelle de *Ravensara aromatica* est réservée plutôt à la médecine. Les feuilles sont considérées comme un grand remède contre les maux de corps et de l'esprit. Les écorces sont utilisées contre les maux de tête en les écrasant avant de les inhaler.

1.3. Généralités sur les huiles essentielles et la distillation :

3.1. Les huiles essentielles :

3.1.1. Définitions :

L'huile essentielle, selon la norme AFNOR NF T 75-006 (février 1998) est définie comme « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de citrus, soit par distillation sèche. L'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

Cette définition ne tient pas compte des autres modes d'extraction (extraction au solvant, enfleurage). On adopte alors la définition suivante : « les huiles essentielles sont des substances chimiques volatiles, extraites de diverses parties de végétaux (feuilles, fleurs, racines, écorces, bois). Leur extraction peut s'effectuer par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques.

Les composants aromatiques d'une plante peuvent varier en fonction du biotope : ensoleillement, conditions climatiques, le type de sol, la saison de cueillette. La variation des composants aromatiques induit inévitablement des variations au niveau des propriétés chimiques de la plante et de l'huile essentielle que l'on extrait. En effet, pour une même variété botanique, il existe plusieurs chémotypes c'est à dire des plantes fournissant des huiles essentielles de composition chimique différente. La variabilité chimique est d'origine génétique mais elle dépend également du biotope.(6)

3.1.2. Huile essentielle et normes :

La normalisation est l'ensemble des règles et techniques résultant de l'accord des producteurs et des clients- utilisateurs. Ainsi, il existe plusieurs normes qui peuvent être nationales ou internationales dont les plus connues sont la norme internationale ISO (Organisation Internationale de Standardisation), la norme américaine EOA (Essential Oil Association) et la norme française AFNOR (Association Française de Normalisation).

Chaque pays peut avoir sa propre norme qui est établie par le groupement des producteurs et des utilisateurs locaux.

Selon les normes des huiles essentielles, diverses règles sont appliquées telles que :

- Les règles générales d'étiquetage et de marquage des récipients
- Les règles de dénomination
- Les règles d'analyses physiques et techniques. (Cf. Annexe VI et VII)

3.1.3. Points forts :

- Les huiles essentielles sont des produits de forte valeur ajoutée bien plus intéressante que la vente des plantes en l'état.
- Ce sont des produits naturels, de forte concentration qui possèdent des arômes analogues à ceux de la plante d'origine.
- La demande reste croissante même si les produits synthétiques tendent à envahir le marché du fait que le public apprécie mieux les produits naturels.

3.1.4. Points sensibles :

- Les huiles essentielles sont des produits facilement oxydables. Cette réaction d'oxydation altère sa qualité si les conditions de stockage ne sont pas respectées rigoureusement.
- Le marché mondial est spéculatif car il est géré par les gros négociants. Il faut donc bien connaître l'évolution et la demande du marché.

3.2. La distillation à la vapeur :

3.2.1. Définition :

Le procédé consiste à pulser de la vapeur générée par une chaudière dans une cuve contenant les matières premières à traiter constituées par diverses parties de la plante (feuille, tige, écorce, racine, fleur,...).

3.2.2. Principe :

Le végétal n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau traverse la masse végétale disposée sur des plaques perforées. Sous l'action de la température, le passage de la vapeur dans la cuve provoque l'éclatement des cellules et la libération des essences.

A la sortie du récipient, la vapeur chargée d'huile essentielle est condensée dans un serpentin refroidi par un courant froid. Un séparateur ou essencier recueille l'eau-huile et permet de récupérer l'essence par différence de densité. (11) (19)

I.4. Synthèse des travaux antérieurs sur l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* :

Les composants aromatiques d'une plante varient en fonction de divers paramètres tels que l'ensoleillement, l'altitude, le type de sol, la position topographique,...la variation de ces composants aromatiques induit inévitablement des variations au niveau des propriétés chimiques de la plante et de l'huile essentielle que l'on extrait.

Des études scientifiques sur le *Ravensara aromatica* et ses huiles essentielles ont été menées à Madagascar. Elles font apparaître une grande hétérogénéité des caractéristiques physico-chimiques et de la composition chimique de l'huile.

4.1. Rendement en huile essentielle:

D'après l'étude bibliographique, l'huile essentielle se trouve dans les feuilles et dans l'écorce. Ainsi, le rendement varie suivant la partie distillée.

Tableau 2: Comparaison du rendement (v/p) en huile essentielle de *Ravensara aromatica*

	Littérature	Raharivelomanana (8)	Mollenbeck (5)	Razafinimanana (16)
Rendement (%)	Feuilles	0,80	2,00	0,33-0,68
	Ecorce	1,95	2,20	

Les différentes parties aériennes de la plante ne présentent pas la même teneur en huile essentielle. Le rendement en huile essentielle extraite à partir de l'écorce est légèrement supérieur à celui en huile extraite à partir des feuilles.

4.2. Caractéristiques physico-chimiques :

Les études effectuées sur les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* consistent en la détermination de la densité, de l'indice de réfraction, du pouvoir rotatoire.

Tableau 3: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* à partir des feuilles.

	Théron (17)	O.Behra (21)	Raharivelomanana(8)
Densité	0,9051	0,884 à 0,900	0,882
Indice de réfraction	1,4619	1,4830 à 1,4890	1,4878
Pouvoir rotatoire	-18°7	-23°35 à -20°	+2°50

Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* varient alors suivant les littératures. En outre, les densités citées ci-dessus sont inférieures à celle de l'eau. Ce sont donc des huiles dites légères. La déviation polarimétrique varie de -18°7 à -23°35 sauf pour le cas des études de RAHARIVELOMANANA. L'indice de réfraction se situe entre 1,4619 à 1,4890.

4.3. Composition chimique :

Les compositions chimiques des huiles essentielles d'écorces et de feuilles décrites dans la littérature sont résumées respectivement dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Composition chimique de l'huile essentielle de l'écorce de *Ravensara aromatica*.

Référence Molécules	(17)	(5)	(7)	(8)
α -pinène	0,66	-	0,1-0,3	0,09
Camphène	Trace	-	0,2-0,4	0,21
β -pinène	0,83	0,1	0,1-0,2	0,03
Sabinène	1,46	-	-	-
β -myrcène	0,42	0,1	Trace	0,03
Limonène	2,03	2,0	0,1-0,2	0,03
1.8-cinéole	14,03	0,2	Trace	0,02
γ -terpinène	0,81	-	-	0,004
p-cymène	0,43	-	Trace	0,005
Terpinolène	0,33	-	Trace	0,006
Linalol	0,31	2,1	2,0-6,8	6,83
- β -caryophyllène	2,95	0,1	-	-
Methyl chavicol	-	94,9	90-95	90,61
Methyleugenol	-	0,3	-	0,59
Citronellal	37.20	-	-	-
Citronellol	5.89	-	-	-

Tableau 5 Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Ravensara aromatica*

Référence Molécules	(17)	(8)	(5)	(7)
α -pinène	3,67	1,2	0,3	3-6,4
α -thujène	-	0,64	-	0,4-2,1
Camphène	0,71	0,52	-	0,9-1,8
β -pinène	3,04	0,91	0,3	2,2-2,9
Sabinène	13,40	3,89	-	10,2-16,4
β -myrcène	1,52	4,54	0,2	5-7,2
α -phellandrène	0,63	5,02	-	-
α -terpinène	-	23,91	0,4	1,8-7,1
Limonène	0,83	18,84	-	13,9-22,5
1.8-cinéole	60,75	2,53	0,1	1,8-3,3
cis- β -ocimène	-	2,41	0,6	0,3-1
γ -terpinène	1,02	4,47	-	1,8-4,1
citronellal	-	-	0,1	-
p-cymène	Tr	2,87	0,4	0,5-1,6
- α -terpinolène	0,27	23,91	-	-
Linalol	0,35	4,74	1,2	3-5,7
- β -caryophyllène	0,28	3,84	1,5	1,5-8,4
Terpinen-4-ol	-	-	0,5	1,7-4,8
Methyl chavicol	-	0,11	3,2	2,4-11,9
citronellol	-	-	0,3	-
Methyleugenol	-	5,24	86,6	-
Eugenol	-	0,20	0,3	-
Elemicine	-	-	2,7	-
α -terpineol	8.03	-	-	-
Iso-ledene	-	-	-	0.9-14.2

Tr : Trace

D'après Théron (17), la composition chimique varie suivant la partie distillée. Le 1.8-cinéole (60,75%), le sabinène (13,40%) et le α -terpineol (8,03%) représentent les constituants majeurs de l'huile extraite à partir de feuilles. Pour l'écorce, elles sont constituées principalement par le citronellal (37,20%), le 1.8-cinéole (14,03%), le citronellol (5,89%) et le α -terpineol (4,19%). En effet, cette composition chimique est analogue à celle du *Cinnamomum camphora* connu sous le nom vernaculaire Ravintsara.

RAHARIVELOMANANA(8), par analyse chromatographique en phase gazeuse, a pu identifier les constituants des huiles essentielles étudiées. Au cours de cette étude, 45 pics sont détectés. La composition de l'huile essentielle extraite à partir de feuilles et celle à partir de l'écorce présente une grande différence. Pour les feuilles, les essences sont plus riches en hydrocarbures terpéniques (80,23%) qu'en produits oxygénés. Les feuilles sont constituées surtout de α -terpinène (23,91%), de limonène (18,84%) et de méthyl-eugénol (5,24%). Les écorces sont plus riches en produits oxygénés qu'en hydrocarbures terpéniques. Les principaux constituants sont le méthyl-chavicol (90,61%) et le linalol (6,83%).

Selon MOLLENBECK (5), l'huile de l'écorce contient une concentration élevée en méthyl-chavicol (94,9%) contre le linalol (2,1%) et le limonène (2,0%). D'autre part, dans les huiles essentielles de feuilles, 87 % des constituants chimiques sont identifiés comme le méthyl- eugenol contre 3,2% de méthyl-chavicol.

L'étude de O.Behra et C.RAKOTOARISON (7) a permis de clarifier la confusion entre le Ravintsara, ravensara et havozo d'après leur composition chimique :

- L'huile essentielle de feuille de *Ravensara aromatica* est riche en sabinène (10,2-16,4%), myrcène (5-7,2%), 1.8-cinéole (1,8-3,3%), linalol (3-5,7%) et limonène (13,9-22,5%).
- L'huile essentielle de havozo produite à partir de l'écorce de *Ravensara aromatica* est exclusivement constituée de méthyl-chavicol (90-95%) et de linalol (2,0-6,8%).
- L'huile essentielle de Ravintsara obtenue à partir des feuilles de *Cinnamomum camphora* est constituée principalement par le 1.8-cinéole (53-68%), le sabinène (12-15%) et l' α -terpineol.

Les résultats cités par ces divers chercheurs présentent une différence considérable du point de vue composition chimique. Cette observation nous amène à aborder l'étude de la variation de la composition chimique des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* en fonction de quelques facteurs : l'altitude, les conditions climatiques, les conditions écologiques, la durée de séchage de la matière première, la cinétique de distillation.

CONCLUSION PARTIELLE I

Le *Ravensara aromatica* s'acclimate très bien sur la côte Est de Madagascar. Les pluies abondantes et bien réparties toute l'année, l'absence de véritable saison sèche et le climat tropical humide de la région de Betanimainty favorisent son développement.

Il s'adapte parfaitement dans une altitude de 700 à 1000m et en tant qu'héliophile, il demande un ensoleillement élevé.

La zone d'étude est sous contrôle du groupement de Betanimainty qui est une association des paysans dont la principale activité est de produire des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* à l'aide d'un alambic de capacité industrielle.

Actuellement, aucune norme internationale n'est établie sur cette huile essentielle. D'après l'étude bibliographique, on peut extraire de l'huile essentielle à partir de l'écorce et des feuilles. Les résultats cités de la composition chimique et des caractéristiques physico-chimiques sont très hétérogènes du fait qu'il y avait une confusion entre Ravintsara, *Ravensara aromatica* et Havozo. En effet, des études récentes ont proposé l'appellation suivante :

- Ravintsara pour l'huile essentielle de *Cinamomum camphora*
- *Ravensara aromatica* pour l'huile essentielle des feuilles de *Ravensara aromatica*
- Havozo produit à partir de l'écorce de *Ravensara aromatica*

L'étude antérieure des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* donne une idée de la composition quantitative et qualitative de l'huile essentielle. A cet effet, cette étude nécessite des matériels et de méthodologie adéquats.

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODOLOGIE DE TRAVAIL

II.1. Matériels :

2.1.1. Matériel végétal :

Pour notre étude, il apparaît nécessaire de préciser la qualité des matières premières selon les 5 critères suivants :

- La variété botanique :
Du fait de l'existence de plusieurs noms vernaculaires de la plante, il faut préciser le nom latin de la plante. L'identification botanique sur le terrain est assurée par un spécialiste confirmant le nom de la plante étudiée qu'il s'agit de *Ravensara aromatica Sonnerat*.
- Origine géographique de la plante :
Le matériel végétal est collecté dans la forêt de Betanimainty sur 3 régions différentes : Amparihibe, Besakay et Bemanja.
- Partie de la plante :
Il s'agit d'une étude à partir des feuilles issues de petits rameaux. Les tiges sont exclues de la distillation. Cette biomasse foliaire est prise sur toute la partie du houppier : partie supérieure, partie intermédiaire, partie inférieure, sans tenir compte de l'âge et du degré d'ensoleillement des feuilles.
- Préparation préliminaire :
La masse volumique des feuilles est assez élevée du fait de sa rigidité mais aucun traitement particulier tel le broyage n'est envisagé.
3 types de feuilles sont distillées afin de pouvoir contrôler l'influence du séchage des feuilles avant la distillation :
 - Des feuilles fraîchement cueillies.
 - Des feuilles distillées après 24 heures de séchage naturel
 - Des feuilles séchées pendant 48 heures avant la distillation
- Culture :
Il faut signaler qu'il s'agit des plantes sauvages donnant des produits généralement plus actifs.

2.1.2. Matériel de collecte :

Du fait de la diminution de la surface forestière due à la surexploitation humaine et à la mauvaise gestion des ressources naturelles, l'utilisation des matériels conçus pour la collecte des feuilles s'avère nécessaire telle que la pratique des grimpettes munis d'un Harnais élagueur, l'utilisation d'échenilloir.

Ces techniques utilisées par des spécialistes sont très efficaces du point de vue protection de l'environnement et réduisent la diminution forestière. Elles sont bien appréciées par les paysans même si cette nouvelle technique s'avère difficile.



Photo 2 : *Ravensara aromatica* avant récolte



Photo 3 : *Ravensara aromatica* après récolte

2.1.3. Matériels et techniques d'extraction d'huile essentielle :

Le mode de distillation utilisé est l'extraction à la vapeur d'eau.

2.1.3.1. Alambics :

2 alambics sont installés dans la région de Betanimainty près d'une source d'eau. La caractéristique de ces alambics est que la vapeur générée par une chaudière traverse la masse végétale. Les matières premières ne sont pas en contact avec l'eau.

L'appareil se compose des parties suivantes :

- 1) Un foyer où se trouve les bois de chauffe
- 2) Une chaudière qui est le générateur de vapeur
- 3) Une cuve ou cucurbite dans laquelle les parties des plantes à distiller se trouvent au-dessus d'une plaque perforée. Le passage de la vapeur se fait de bas en haut en traversant la matière à distiller.
- 4) Un chapiteau dans lequel circule la vapeur chargée d'huile essentielle.
- 5) Un serpentín dans un condenseur où le mélange vapeur-huile essentielle se condense.
- 6) Un essencier qui n'est pas de modèle courant permet de séparer l'huile essentielle de l'eau.
Cet essencier permet de recueillir à la fois les huiles essentielles plus légères que l'eau dites huiles légères et celles qui sont plus lourdes.
- 7) Un château d'eau pour l'approvisionnement en eau des 2 alambics.

Caractéristiques de l'alambic :

- Géométrie :
Le rapport entre hauteur et diamètre (1,70) est compris entre 1,5 et 2. ce qui indique une meilleure circulation de la vapeur à l'intérieur de la cuve.
- Capacité :
Les 2 alambics ont une capacité de 80 litres
- Charge par extraction : 12,5 Kg de feuilles de *Ravensara aromatica*

- Matériau :
Le type de matériau utilisé est l'acier inoxydable. Ce qui permet de réduire le risque de coloration des huiles par la réaction entre huile et matériau.
- Entassement :
Si les feuilles sont entassées sans précaution dans la cuve, la masse s'oppose au flux de vapeur. On aura dans ce cas une mauvaise circulation de vapeur (11). On adopte alors de rapport d'entassement qui est le rapport entre le poids des feuilles introduites et la capacité de la cuve de 0,15.

Avantages de ces alambics :

- C'est un équipement simple et robuste sans négliger la performance en rendement et en qualité de production.
- La manipulation plus aisée de conception simple permet la possibilité de réparation locale.

Inconvénients de ces alambics :

- L'appareil est dépourvu de système de contrôle de la température et de la pression de vapeur d'eau.
- Le débit de vapeur fourni par la chaudière n'est pas constant. Il y a parfois une variation brusque de la température puisque l'alimentation en bois de chauffe est discontinue.

Tableau 6 :Cycle de production

Procédure de production	Opération	Matériel utilisé	Observation
Nettoyage	Lavage et nettoyage	Eau chaude, vapeur	Lavage et nettoyage de la cuve et du serpentín avec de l'eau chaude et de la vapeur
Collecte de matière première	Collecte des feuilles	Grimette, échelle	Opération effectuée par des spécialistes
Traitement et préparation des matières premières	Triage des feuilles	Opération manuelle	<ul style="list-style-type: none"> - Enlèvement des corps étrangers (boues, feuilles autres que la plante étudiée...) - Sélection des feuilles avec petits rameaux.
	Séchage ou non des feuilles		Séchage à l'air libre
	Pesage	Balance, silicagel	Prise du poids de feuilles et prise d'humidité des feuilles
Préparation de l'alambic	Chargement de l'alambic		Tassage des feuilles dans l'alambic
	Contrôle de chaque partie de l'alambic		Vérification : <ul style="list-style-type: none"> - Du niveau d'eau de la chaudière - De l'approvisionnement en eau du serpentín - Du niveau d'eau sur les joints hydrauliques
Distillation	Extraction de l'huile essentielle	Cuve	
	Récupération des produits finis	Essencier	Récupération des huiles légères et des huiles lourdes à l'aide d'une éprouvette
	Décantation	Ampoule à décanter	Séparation des huiles essentielles de l'eau florale par la différence de densité
Conditionnement et stockage	Conditionnement et stockage	Flacons ambrés	Stockage à l'abri de lumière et de chaleur

Les feuilles récoltées par les grimpeurs sont triées sur place pour faciliter son transport jusqu'à l'unité de distillation.



Photo 4 : Cueillette des feuilles



Photo 5 : Récupération des huiles essentielles

2.1.3.2. Matériel et technique de décantation :

La séparation de l'huile essentielle est réalisée dans une ampoule à décanter où le mélange eau florale-huile essentielle se sépare en 3 phases non miscibles. Une phase aqueuse, constituée généralement par l'eau se situe dans la partie intermédiaire entre 2 phases organiques de densité plus faible et plus grande que l'eau. Une phase organique dite huile légère surnage dans la partie supérieure tandis qu'une phase organique dite huile lourde se situe dans la partie inférieure.

Le matériel utilisé est une ampoule à décanter de 500ml.

Dans cette étude, on a remarqué 2 groupes d'huiles essentielles sur les échantillons analysés :

- Groupe I : uniquement des huiles légères sont présentes
- Groupe II : on a remarqué la présence uniquement d'huile lourde ou simultanément d'huile lourde et d'huile légère.

2.1.4. Matériels et technique d'analyse au laboratoire :

2.1.4.1. Matériel et technique densimétrique :

La densité de l'huile essentielle est définie par le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle par la masse d'un égal volume d'eau distillée à la même température.

La mesure de la densité se fait à l'aide d'un pycnomètre de 5 ml par des pesées successives de volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température 20°C.

La température de la salle est différente de 20°C, on aura donc comme mode de calcul :

$$D_t = \left(\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) \times \Delta + 0.0012 \times \left[1 - \left(\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) \times \Delta \right]$$

Δ est la densité de l'eau à la température de la mesure (température de la salle). La précision de mesure est de ± 0.0005 . (13)

2.1.4.2. Matériel et technique de détermination de l'indice de réfraction :

C'est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée traversant l'huile essentielle à une température constante t égale à $20\text{ }^\circ\text{C}$. C'est un indice important pour vérifier la pureté d'une substance.

$$n^t = n_D^t + 0,004 (t' - t) \quad \begin{array}{l} n_D^t : \text{réfraction à la température de la salle} \\ t' : \text{température de détermination} \end{array}$$

L'indice de réfraction est une caractéristique physique souvent utilisée dans les analyses des produits industriels ou naturels pour vérifier la pureté d'une substance. Inversement, on peut l'utiliser pour caractériser une solution notamment aqueuse au cours du processus de fabrication. Le but de cette manipulation est de déterminer les facteurs de variation de l'indice de réfraction des solutions aqueuses : influence de la concentration, de la température, de la nature des solutés et de déterminer les indices de réfraction d'une huile essentielle et d'une huile alimentaire. (13)

L'indice de réfraction est déterminé par un réfractomètre d'Abbe.

2.1.4.3. Matériel et technique chromatographique :

– Matériel :

Il s'agit d'un chromatographe marque GIRDEL série 300, avec une colonne capillaire en silice fondue de 25 m de longueur dont la phase stationnaire est constituée par DB-WAX. L'intégrateur-calculateur-enregistreur est un INTERSMAT ICR 1B.

– Généralités :

La chromatographie, méthode d'analyse immédiate, sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz)qui balaye continuellement la colonne, le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé)qui constitue la colonne chromatographique.

La chromatographie est basée sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans l'échantillon et obtenue par la partition des solutés entre les phases fixe et mobile.

Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à :

- Une force de rétention (affinité du soluté pour la phase fixe)
- Une force de mobilité (entraînement du soluté par la phase mobile : dépend de la solubilité de la molécule)

La résultante de ces deux forces étant variable selon la molécule, chacune d'elles migrera à une vitesse qui lui est propre.

– Principe :

La C.P.G. est une chromatographie de partage : lorsque les substances à séparer sont gazeuses ou lorsqu'on peut les vaporiser sans décomposition à des températures relativement élevées, un gaz vecteur pousse l'échantillon à analyser dans une colonne. Cette colonne est remplie d'une phase liquide, la phase stationnaire retenue par un support solide.

Pour des conditions expérimentales déterminées, c'est à dire température et pression de travail, nature de colonne,...la CPG permet une analyse qualitative et quantitative.

- le temps de rétention (durée entre le moment de l'injection et de la détection) est caractéristique d'un composé ; il permet ainsi une analyse qualitative.
- La surface du pic obtenu lors de l'analyse, est proportionnelle à la quantité injectée, elle permet ainsi une analyse quantitative.

– Conditions de la manipulation :

Certains réglages seront constants pendant toute la manipulation, soient :

- Pression P du gaz vecteur (H_2) :0.5 bar
- Débit du gaz vecteur :60 ml/mn
- Type d'injecteur : diviseur
- Type de détecteur : FID
- Température de l'injecteur et du détecteur :230°C
- Vitesse de défilement du papier :5mm/min
- MIN.AREA :6000
- Quantité injectée :0.1 μ L
- Durée d'analyse :40 mn

– Appareillage :

Un chromatographe est constitué en première approximation de trois organes essentiels :

- L'injecteur :

Il permet d'introduire un liquide qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne. A l'aide d'une seringue hypodermique de petite capacité, on pique au travers du septum, afin que l'extrémité de l'aiguille arrive au-dessous du niveau de l'arrivée du gaz porteur, puis on pousse le piston pour réaliser l'injection.

- La colonne :

C'est l'organe principal. Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre. Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte.

On utilise des colonnes capillaires, formées d'un tube de silice fondue dont le diamètre intérieur est de l'ordre de 0,33 mm et la longueur de 25 m..

- Le détecteur :

Le détecteur utilisé est celui à ionisation de flamme. Son principe est de brûler, dans une flamme d'hydrogène, l'effluent apporté par de l'azote (gaz vecteur). Sous l'effet d'un champ électrostatique, il se forme des ions carbone de charge positive qui sont précipités sur une électrode où ils créent un courant d'ionisation que l'on amplifie grâce à un électromètre amplificateur.

Sur un enregistreur, on obtient par conséquent un signal proportionnel au débit-masse du soluté dans le détecteur.

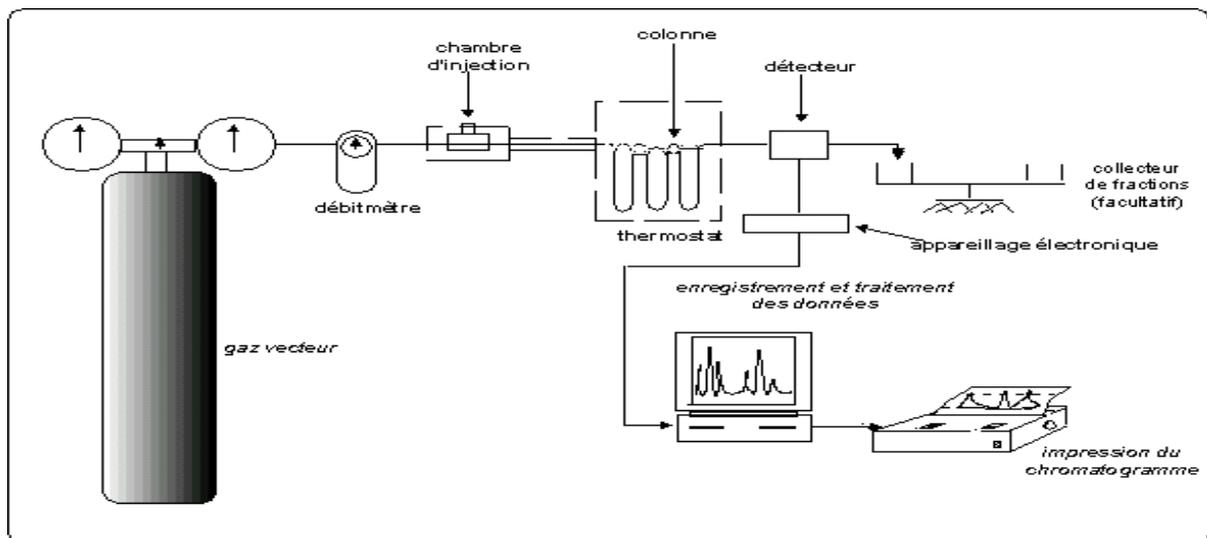


Schéma 2: Principe simplifié d'un chromatographe pour CPG

Source : (20)

II.2. Méthodologie de travail :

2.2.1. Schéma récapitulatif de la méthodologie de travail :

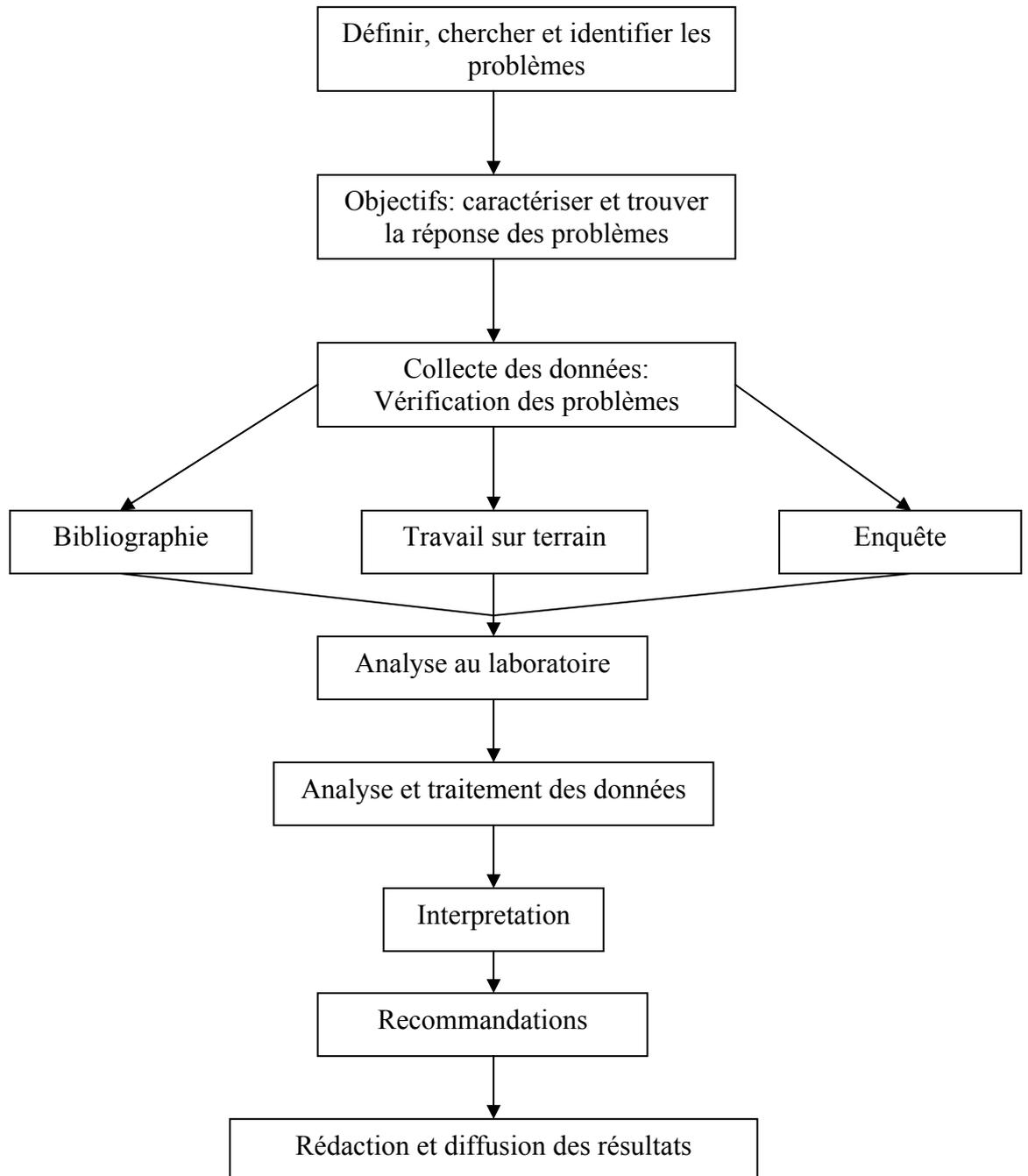


Schéma 3: récapitulation de la méthodologie de travail

2.2.2. Méthode de collecte des données :

2.2.2.1. Bibliographie :

Une grande partie de la recherche a été consacrée à l'étude bibliographique du fait que les résultats cités dans les publications ultérieures sur le *Ravensara aromatica* et son huile essentielle présentent une grande hétérogénéité du point de vue composition chimique. C'est pourquoi l'étude récente effectuée par O. Behra consistait à résoudre le problème de confusion entre le Ravintsara et le Ravensara.

Cette étude bibliographique est appuyée par des collectes d'information et de documentation effectuées dans de divers bureaux administratifs, organismes et société privées, bureaux scientifiques, espace internet et dans des bibliothèques.

- Bibliothèque de l'ESSA, de l'Université, du CITE,
- Centres de documentation des divers bureaux administratifs : CIREF Moramanga, ministère du commerce, ministère des eaux et forêts.
- Centre de documentation des organismes et sociétés privées : AUPELF-UREF, PNUD, PRONABIO-SYPEAM, LABEL CBD.
- Centre de documentation des bureaux scientifiques : parc botanique de Tsimbazaza, IMRA, FOFIFA.
- Centre de connection à l'internet : CITE, CYBERCAFE

2.2.2.2. Descente sur terrain :

La descente sur terrain a été effectuée selon différentes approches : observation directe, entretien avec les spécialistes, entretien avec les personnes ressources, entretien avec les encadreurs,...

2.2.2.2.1. Observation directe :

C'est le meilleur moyen de voir la réalité en face. Elle permet d'ailleurs de vérifier, de corriger ou de confirmer les informations recueillies par d'autres moyens notamment l'étude bibliographique, l'enquête effectuée auprès des paysans collecteurs.

2.2.2.2.2. Entretien avec les spécialistes :

Des entretiens avec des spécialistes ont été faits durant la descente sur terrain dont un chercheur et un botaniste du FOFIFA.

2.2.2.2.3. Entretien avec les membres du groupement de Betanimainty :

Des entretiens auprès des membres du groupement dont la principale activité est d'extraire des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* à l'aide d'un alambic de capacité industrielle sont menées avant, pendant et après la descente sur terrain. Le but est de collecter des informations de base sur le thème de l'étude.

2.2.2.2.4. Echantillonnage :

La distillation est assurée par la prise de 6 arbres qui peuvent fournir le maximum d'information mentionnée sur la fiche de collecte et la fiche de distillation (cf annexeIV et V) et qui peuvent donner une quantité minimale de matière végétale de 12,5 Kg qui est la capacité de chargement de l'alambic utilisé. Ces arbres sont répartis sur 3 régions différentes dans la forêt de Betanimainty.

Tableau 7 : Effectif des échantillons d'huile essentielle

N° de l'arbre		1	2	3	4	5	6
Région		Besakay	Besakay	Amparihibe	Amparihibe	Bemanja	Bemanja
Echantillons à partir des feuilles fraîches	H.I	0					
	H.L	3					
	M.P	1					
Echantillons à partir des feuilles séchées pendant 24 heures	H.I	0	3	3	4	3	4
	H.L	3	0	0	0	3	4
	M.P	1	1	1	1	1	1
Echantillons à partir des feuilles séchées pendant 48 heures	H.I	2				3	2
	H.L	3				2	3
	M.P	0				1	1
Total des échantillons		13	4	4	5	13	15

H.I : Huile légère

H.L : huile lourde

M.P : Mélange pondéré

Avec les 10 distillations effectuées, le nombre d'échantillons s'élève à 54. L'huile étant recueillie par heure de distillation, il s'avère nécessaire de faire un mélange afin de déterminer la composition chimique globale de l'huile essentielle pour une distillation. Cette opération est réalisée à l'aide des microseringues de l'ordre de microlitres en respectant la proportion avant de poursuivre l'analyse chromatographique.

Pour certaines distillations, le nombre d'échantillons pendant 4 heures s'élève à 8 du fait de la présence en même temps d'huile légère et d'huile lourde dans l'essencier.

2.2.2.3. Analyse et traitement des données :

Les données recueillies pendant l'étude sur le terrain étaient des données brutes et en désordre. Le but est de mettre en ordre les données et d'appliquer des méthodes adéquates (mathématique, statistique) pour faire des analyses et des traitements des données pour qu'elles puissent être disponibles à interpréter.

- Les données quantitatives obtenues par l'expérimentation et la documentation sont analysées à partir des différentes courbes et des calculs mathématiques traitées sur EXCEL.
- Les données quantitatives et qualitatives recueillies pendant l'étude sont traitées par le test Chi-2 à l'aide d'un logiciel spécifié :statbox.

Test d'indépendance du X^2 de Pearson :

Définition : on appelle répartition théorique des unités statistiques d'un échantillon suivant deux critères la répartition que l'on aurait si ces deux critères étaient indépendants.

$$n_{i,j}' = n p_{i.} p_{.j} = n_{i.} n_{.j} / n$$

dans laquelle les termes $n_{i.}$, $n_{.j}$ sont les effectifs marginaux calculés sur le tableau de données et $p_{i.}$ et $p_{.j}$ les proportions marginales.

La statistique X^2 utilisée pour comparer les répartitions théoriques et observées est définie par :

$$X^2 = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q (n_{i,j} - n_{i,j}')^2 / n_{i,j}'$$

La loi de X^2 sous l'hypothèse d'indépendance est loi du χ^2 de degré de liberté v :

$$v = (p - 1) (q - 1)$$

La région critique = $[\chi_{\alpha}^2, +\infty[$, χ_{α}^2 étant le nombre auquel une proportion α de X^2 est supérieure si l'hypothèse d'indépendance est vraie.

Conduite du test :

- On Pose l'hypothèse d'indépendance de 2 critères dans une expérience. Soit plusieurs échantillons pouvant être classés selon un certain nombre de colonnes (critère 1) et de lignes (critère 2).
- On définit le risque, ici 5%
- Si le chi-carré observé est plus grand que le chi-carré théorique, alors on rejète l'hypothèse de départ.

2.2.2.4. Limites de l'étude :

- L'interdiction d'abattre des arbres et le respect de l'environnement obligent l'utilisation de grimpettes et d'échenilloir pour la collecte des feuilles. En outre, cette technique, très avantageuse du point de vue forestier, n'est pas toujours efficace au cas où le vent est fort. De même quand il pleut, la montée des grimpeurs sur les arbres est très dangereuse, l'arbre devenant très glissant.
- Malgré la durée de séjour très courte sur le terrain, 6 distillations sur 2 alambics ont été effectuées par jour. Par conséquent, le temps de nettoyage des alambics qui peuvent influencer la qualité et la quantité de l'huile essentielle, est trop court. Ainsi, le nombre de distillation est très limité. Sur 3 distillations sur lesquelles des huiles légères seulement sont présentes, l'effet du séchage n'est pas mis en valeur et les distillations sont faites à partir des feuilles issues de séchage naturel pendant 24 heures uniquement.
- La littérature disponible concernant la plante et son huile essentielle est très limitée
- Sur quelques échantillons, la détermination de la densité est impossible à cause de l'insuffisance de la capacité disponible (besoin minimal 5 ml).

CONCLUSION PARTIELLE II

Il est à noter que la qualité de la matière première joue un rôle important sur celle des produits finis. Des feuilles avec petits rameaux sont distillées. Il s'agit des feuilles fraîchement cueillies, séchées pendant 24 heures et 48 heures.

Des matériels spécifiques sont utilisés par des spécialistes pour la collecte des feuilles afin d'éviter d'abattre les arbres. Ce sont des grimpettes et échenilloir dont leur utilisation respecte mieux l'environnement.

Deux alambics d'une capacité de 80 litres très performant sont installés dans la région de Betanimainty. Le mode de distillation adopté est l'entraînement à la vapeur avec des prélèvements fractionnés des huiles essentielles afin de pouvoir étudier la cinétique de distillation.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour réunir toutes les données nécessaires à la réalisation de ce travail. Les traitements mathématiques et statistiques permettront d'étudier la variation de la quantité et de la qualité de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica*.

PARTIE3 : ETUDE ANALYTIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Ravensara aromatica*

III.1. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* :

3.1.1. Rendement :

Le rendement exprimé en pourcentage est le rapport entre le poids d'huile essentielle obtenue et la quantité de feuilles chargées dans l'alambic.

Pour cette étude, le rendement est calculé suivant 2 méthodes :

- Rendement par rapport à la matière fraîche.
- Rendement par rapport à la matière sèche en tenant compte l'hydratation des feuilles calculées à partir de la mesure de l'humidité.

(cf annexe II)

3.1.2. Qualité organoleptique :

L'analyse sensorielle est une source d'information essentielle qui, dans bien de cas, reflète les attentes et les tendances des consommateurs. L'analyse a été effectuée en observant et en inhalant directement l'huile essentielle. L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle. Dans cette étude, 3 critères sont considérés pour évaluer la qualité organoleptique :

- L'odeur
- La couleur
- L'aspect

3.1.3. Composition chimique :

Les huiles essentielles étant des mélanges complexes et variables de constituants appartiennent à 2 groupes caractérisés par des origines biogénétiques : le groupe des hydrocarbures terpéniques et le groupe des produits oxygénés

3.1.4. Propriétés microbiologiques :

L'huile essentielle de *Ravensara aromatica* présente un grand intérêt du point de vue aromathérapeutique du fait de sa propriété antivirale puissante. Par contre, son pouvoir antibactérien et antifongique reste moins puissant par rapport à l'essence de l'écorce.

En effet, l'huile essentielle de feuilles possède une forte activité sur des souches de *Salmonella gallinarium* le premier responsable de la diarrhée, le *Staphylococcus* source de l'infection des plaies, le *Clostridium chauveii* et le *Klebsiella oxytoca*.(source LABEL CBD)

3.2.2. Teneur en huile essentielle :

Tableau 10 : Evolution du rendement d'extraction suivant la durée de distillation (%)

	Groupe I				Groupe II			
	min	max	moyenne	écart type	min	max	moyenne	écart type
1h	0,57	0,68	0,63	0,05	0,25	0,71	0,42	0,25
2h	0,13	0,18	0,16	0,03	0,14	0,16	0,15	0,01
3h	0,05	0,07	0,05	0,01	0,12	0,16	0,14	0,02
4h	-	0,02	0,01	0,01	-	0,05	0,02	0,03
	0,80	0,90	0,85	0,05	0,59	0,98	0,73	0,22

Généralement, le rendement de l'huile essentielle diminue avec l'heure d'extraction. Pour les huiles essentielles appartenant au groupe I, le rendement le plus élevé se situe à la première heure de distillation au cours de laquelle les constituants chimiques les plus volatils qui sont très répandus dans la plante sont entraînés en premier par la vapeur. A la deuxième et à la troisième heure, la teneur en huile représente 1/5 et 1/17 du rendement total.

A la quatrième heure de distillation, le rendement est très faible et représente 1/85 seulement du rendement total de l'extraction.

Pour les huiles essentielles du groupe II, l'allure de l'évolution du rendement en huile essentielle est décroissante jusqu'à une teneur très faible de l'ordre de 4% du rendement total.

Pour le premier groupe d'huile, les trois quarts de l'huile essentielle sont obtenus au premier quart du temps de distillation. Pour le groupe II, ils sont obtenus à la deuxième heure. Pendant le reste du temps d'extraction, on n'en tirera qu'un quart. Pour les distillateurs, la situation n'est pas rentable car la durée prolongée de l'extraction entraîne une augmentation de la dépense en énergie (bois de chauffe, eau).

Tableau 11 : Comparaison du rendement d'extraction d'huile essentielle du groupe II (%)

	Rendement en huile légère				Rendement en huile lourde				r HI/HL
	min	max	moyenne	écart-type	min	max	moyenne	écart-type	
1h	0	0,114	0,062	0,058	0,183	0,708	0,360	0,301	0,171
2h	0	0,057	0,030	0,029	0,086	0,158	0,123	0,036	0,244
3h	0	0,038	0,018	0,019	0,117	0,119	0,118	0,001	0,156
4h	0	0,013	0,004	0,008	0	0,033	0,011	0,019	0,394

Le rapport r de l'huile légère et de l'huile lourde est largement inférieur à 1. Ceci confirme que le rendement en huile lourde est de loin supérieur à celui en huile légère. Pour certains échantillons, seules les huiles lourdes existent dès la première heure jusqu'à la fin de distillation.

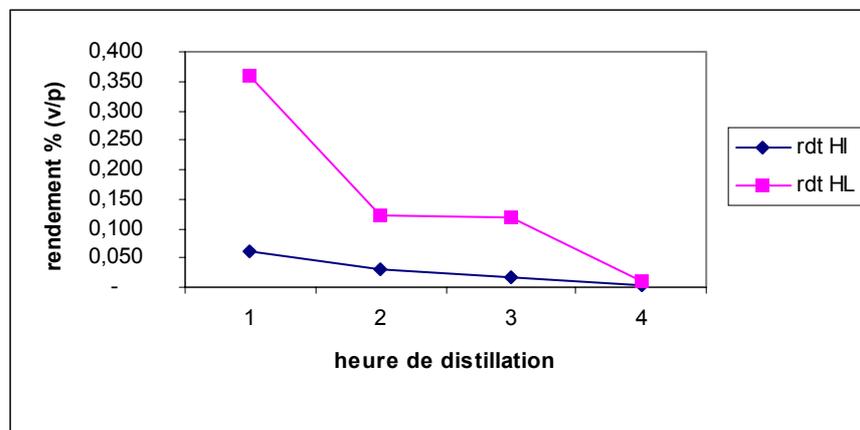


Figure 5: Evolution du rendement en huiles légères et en huiles lourdes du groupe II

Pour les huiles lourdes et les huiles légères, les rendements les plus élevés sont ceux de la première heure. Ils sont très faibles à la fin de la distillation.

3.2.3. Caractéristiques physico-chimiques :

Pour quelques échantillons, la faible quantité d'huile essentielle obtenue ne nous a pas permis de déterminer leur densité.

Tableau 12: Constantes physico-chimiques des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* selon la cinétique de distillation.

	N° arbre	Densité				Indice de réfraction				
		1h	2h	3h	4h	1h	2h	3h	4h	
Groupe I	2	0,8916	0,8913	0,8999		1,4838	1,4841	1,4885		
	3	0,8616				1,4721	1,4691	1,4848		
	4	0,8774	0,8968	0,8926		1,4765	1,4805	1,4895	1,4905	
Groupe II	1	HI								
		HL	1,009	1,0168	1,0155		1,5208	1,5258	1,5241	
	5	HI	0,9916				1,5153	1,521	1,5225	
		HL	0,9971	1,0007	1,0099		1,5179	1,5207	1,5221	
	6	HI	1,0099				1,5208	1,5233	1,5253	1,5248
		HL	1,0063	1,0081	1,0143		1,5201	1,5233	1,5247	1,5258

Pour faciliter la comparaison des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* classées en 2 groupes, nous avons récapitulé dans le tableau suivant la valeur moyenne de chaque constante pour chaque groupe.

Tableau 13: Valeur moyenne des constantes physico-chimiques

	densité				Indice de réfraction			
	1h	2h	3h	4h	1h	2h	3h	4h
Gr I	0,8768	0,8941	0,8963		1,4775	1,4779	1,4876	1,4905
Gr II HI	1,0007				1,5181	1,5222	1,5239	1,5248
Gr II HL	1,0041	1,0085	1,0132		1,5196	1,5233	1,5236	1,5258

Pour les huiles essentielles de *Ravensara aromatica*, la densité et l'indice de réfraction augmentent jusqu'à un maximum à la 4^{ème} heure au cours du temps d'extraction. Pour l'indice de réfraction, les différences de ces valeurs sont significatives entre les deux groupes ; il est de 1,4775 à 1,4905 pour le groupe I ; pour le groupe II, il est de 1,5181 à 1,5248 pour les huiles légères et de 1,5196 à 1,5258 pour les huiles lourdes.

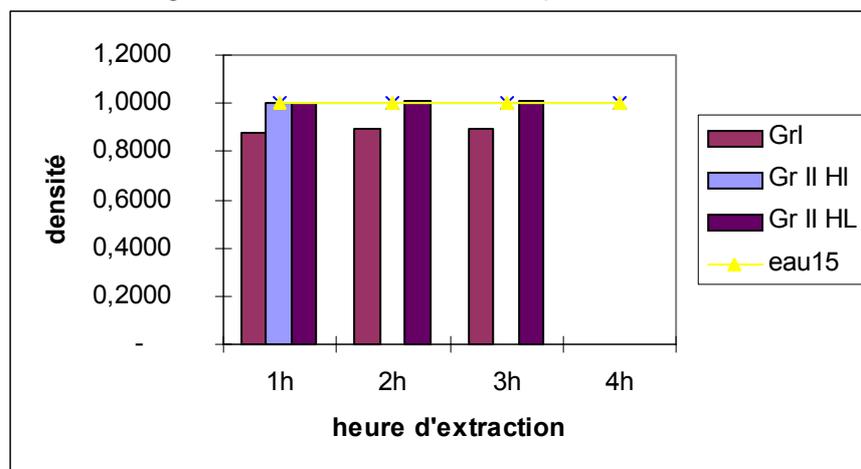


Figure 6: Evolution de la densité de l'huile essentielle suivant la durée d'extraction

D'après l'examen de cette courbe, les densités des huiles essentielles du groupe I (0,8768-0,8963) sont inférieures et à celles du groupe II(1,0041-1,0132). La différence entre ces valeurs est très significative. En effet, la densité des huiles essentielles toujours inférieure à celle de l'eau durant toute la distillation pour le groupe I indique qu'il s'agit des huiles légères uniquement.

Pour le groupe II, la densité des huiles légères est très proche de celle de l'eau tandis que celle des huiles lourdes est légèrement supérieure.

3.2.4. Composition chimique :

La connaissance de la composition chimique d'une huile essentielle s'avère importante car elle permet de contrôler la qualité. En effet, cette composition chimique varie suivant la durée de distillation.

Dans cette étude, 27 échantillons provenant de 6 distillations sont analysés par chromatographie en phase gazeuse afin d'évaluer l'évolution des constituants chimiques selon la cinétique de distillation.

L'évolution de la composition en hydrocarbures et en produits oxygénés de ces échantillons est présentée dans la figure 7 .

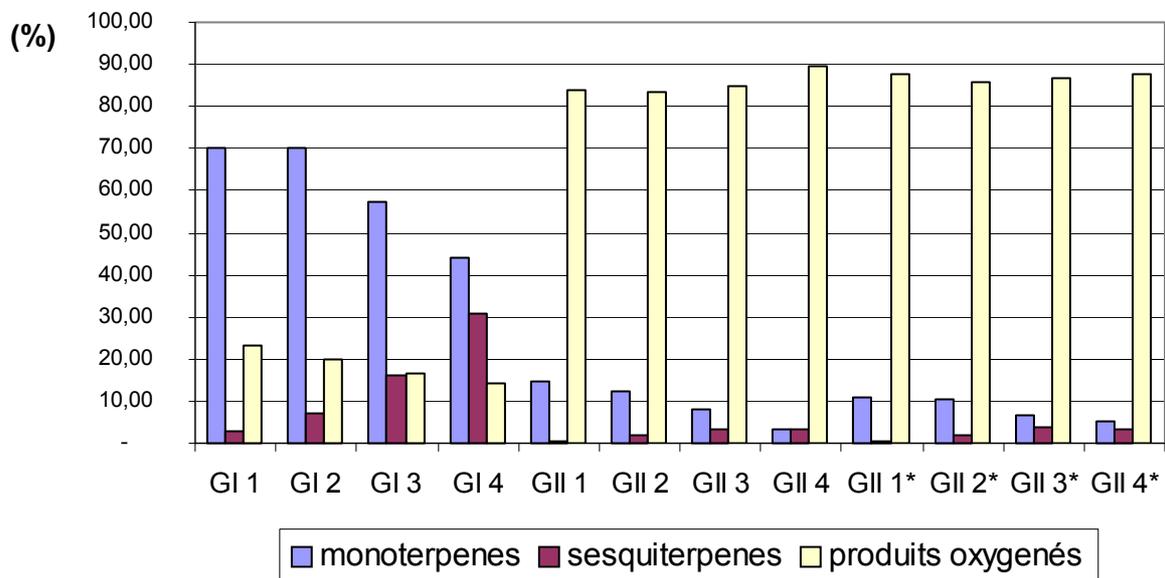


Figure 7: Evolution de la composition chimique (%) de l'huile essentielle suivant la durée d'extraction

- GI 1 : Groupe I de la première heure
- GI 2 : Groupe I de la deuxième heure
- GI 3 : Groupe I de la troisième heure
- GI 4 : Groupe I de la quatrième heure
- GII 1 : Huile légère du groupe II de la première heure
- GII 2 : Huile légère du groupe II de la deuxième heure
- GII 3 : Huile légère du groupe II de la troisième heure
- GII 4 : Huile légère du groupe II de la quatrième heure
- GII 1* : Huile lourde du groupe II de la première heure
- GII 2* : Huile lourde du groupe II de la deuxième heure
- GII 3* : Huile lourde du groupe II de la troisième heure
- GII 4* : Huile lourde du groupe II de la quatrième heure

D'après ce graphe, les huiles essentielles de *Ravensara aromatica* du groupe I sont constituées principalement par des monoterpènes. Ces valeurs décroissent jusqu'à un minimum à la 4^{ème} heure.

De même, les produits oxygénés qui sont présents en faible teneur diminuent selon le temps d'extraction.

Par contre, la concentration en sesquiterpènes qui augmente au cours de la distillation reste faible et représente moins de 20% de l'huile.

Comparé avec les résultats de la littérature (16), la teneur de monoterpènes décroît en fonction du temps d'extraction et celle de sesquiterpènes augmente progressivement. La différence se trouve au niveau de la teneur en produits oxygénés. L'auteur affirme que ce taux augmente et atteint son maximum à la 4^{ème} heure de distillation.

Du point de vue qualitatif, l'essence du groupe II est riche en produits oxygénés. Pour les huiles lourdes et légères, la variation de ces valeurs n'est pas significative selon la cinétique de distillation. En effet, ce taux est légèrement supérieur pour les huiles lourdes par rapport à celui des huiles légères. La concentration en hydrocarbures terpéniques est faible. La teneur en monoterpènes diminue tandis que celle en sesquiterpènes augmente légèrement au cours de l'extraction.

3.2.4.1. Hydrocarbures terpéniques :

Les hydrocarbures terpéniques regroupent les terpènes les plus volatils. Ce sont éventuellement les monoterpènes et les sesquiterpènes dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée.

Tableau 14: Constituants des hydrocarbures terpéniques de l'huile du groupe I suivant l'heure d'extraction. (%)

Constituants	1h	2h	3h	4h
camphène	1,23	1,22	1,07	1,28
δ3-carène	1,86	2,12	2,42	1,66
p-cymène	0,18	tr	tr	tr
limonène	8,70	8,13	7,20	1,87
myrcène+ α -phellandrène	6,25	7,54	7,15	5,38
cis- β ocimène	1,68	1,87	2,00	2,82
α-pinène	12,49	16,48	17,10	14,56
β-pinène	6,25	6,74	6,27	5,04
sabinène	52,39	38,88	24,56	14,38
α -terpinène	2,09	2,60	3,35	4,00
γ-terpinène	2,55	4,28	5,81	6,36
terpinolène	0,68	0,98	1,34	1,52
β -caryophyllène	1,90	3,16	6,96	21,74
germacrène-D	1,78	5,76	13,62	19,39
α -humulène	tr	0,24	1,16	tr

D'après ce tableau, les majeurs constituants terpéniques pour les essences du groupe I varient en fonction de la durée d'extraction.

- A la première heure, ce sont le sabinène (52,39%), α -pinène (12,49%) et limonène (8,70%) qui dominent.
- La deuxième heure est marquée par l'importance de sabinène (38,88%), α-pinène (16,48%) et de limonène (8,13%).
- A la troisième heure, les majeurs constituants sont le sabinène (24,56%), α-pinène (17,10%) et germacrène D (13,62%).

Tableau 15 : Constituants des hydrocarbures terpéniques de l'huile du groupe II suivant la durée d'extraction. (%)

constituants	Huile légère				Huile lourde			
	1h	2h	3h	4h	1*h	2*h	3*h	4*h
camphène	tr							
δ3-carène	tr							
p-cymène	tr							
limonène	50,23	44,9	38,96	52,04	55,11	46,93	40,9	51,03
myrcène+ α -phellandrène	3,68	3,88	2,37	tr	3,39	3,26	tr	tr
cis- β ocimène	tr							
α-pinène	7,51	9,92	6,98	tr	8,62	8,82	7,57	4,58
β-pinène	4,55	3,25	3,18	tr	3,90	2,92	2,67	tr
sabinène	32,34	21,62	13,33	tr	24,72	18,32	9,96	4,59
α -terpinène	tr	tr	1,74	tr	tr	1,07	tr	tr
γ-terpinène	tr	2,03	2,93	tr	0,90	1,83	3,86	tr
terpinolène	tr							
β -caryophyllène	1,66	6,43	13,03	22,25	1,28	8,30	17,38	18,37
germacrène-D	tr	7,93	17,42	25,64	2,03	8,49	17,69	21,41
α -humulène	tr							

Il est à noter que les essences du groupe II présentent des teneurs faibles en hydrocarbures terpéniques. Ainsi, les constituants majeurs des hydrocarbures terpéniques varient selon la cinétique de distillation selon le tableau 16.

Tableau 16 : Constituants majeurs des hydrocarbures terpéniques des huiles du groupe II

	HI	HL
1heure	LIM, SAB, API	LIM, SAB, API
2 heure	LIM, SAB,API	LIM, SAB, API
3heure	LIM, GER, SAB	LIM, GER, BCA
4heure	LIM, GER, BCA	LIM, GER, BCA

API : α-pinène
 BCA : β -caryophyllène
 GER : germacrène-D
 LIM : limonène
 SAB : sabinène

Le limonène reste le principal constituant des hydrocarbures terpéniques malgré la diminution de sa teneur durant la distillation.

3.2.4.2. Produits oxygénés :

Les produits oxygénés renferment plusieurs familles de produits. Ce sont très souvent les, éthers, aldéhydes, oxydes, esters.

Tableau 17: Constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de du groupe I. (%)

	1h	2h	3h	4h
linalol	26,18	12,40	4,72	3,59
1,8-cinéole+β-phellandrène	20,95	14,82	13,23	11,66
Methyl-chavicol	1,80	0,85	0,79	11,96
méthyl eugénol	34,65	54,03	67,98	57,70
terpinène-4 ol	16,40	17,87	13,25	15,07

A la première heure, les principaux produits oxygénés des huiles essentielles du groupe I sont le méthyl eugénol (34,65%), le linalol (26,18%) et le 1.8-cinéole et β -phellandrène (20,95%)

On remarque à la deuxième heure que le méthyl eugénol représente plus de la moitié des produits oxygénés à 54,03%. Ainsi, le terpinène-4ol et le cinéole et β -phellandrène sont de l'ordre de 17,87% et 14,82%.

A la troisième heure, le méthyl eugénol, le terpinène4-ol et le cinéole1-8 et β -phellandrène représentent 67,98%, 15,07% et 11,66%.

Tableau 18: Constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* du groupe II. (%)

	HI				HL			
	1h	2h	3h	4h	1*h	2*h	3*h	4*h
linalol	4,10	1,29	0,60	tr	4,80	1,61	0,90	0,35
1,8-cinéole+ β -phellandrène	0,74	0,31	0,21	5,94	0,36	0,21	tr	0,92
Met-chavicol	5,21	2,38	1,44	0,90	3,61	1,77	1,27	1,01
méthyl eugénol	89,37	95,44	97,38	93,15	90,89	96,04	97,60	97,71
terpinène-4 ol	0,55	0,55	0,35	tr	0,31	0,35	0,21	tr

HI : huile légère

HL : huile lourde

Les huiles légères et les huiles lourdes sont constituées principalement de méthyl eugénol. Sa teneur qui augmente en fonction de la durée d'extraction représente plus de 90% des produits oxygénés. Elle est légèrement supérieure pour les huiles lourdes que pour les huiles légères.

L'évolution de la concentration des constituants chimiques de chaque groupe d'huile est présentée dans les figures 8, 9 et 10.

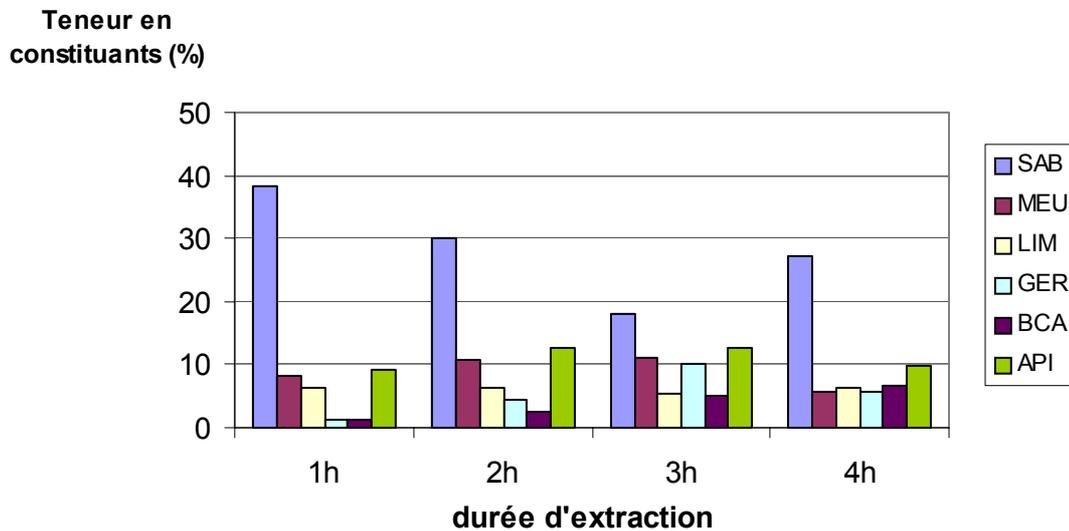


Figure 8: Evolution des constituants chimiques de l'huile du groupe I durant l'extraction.

D'après ce graphe, l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* du groupe I est constituée principalement de sabinène, α -pinène et méthyl eugénol. Leur concentration varie en fonction du temps d'extraction

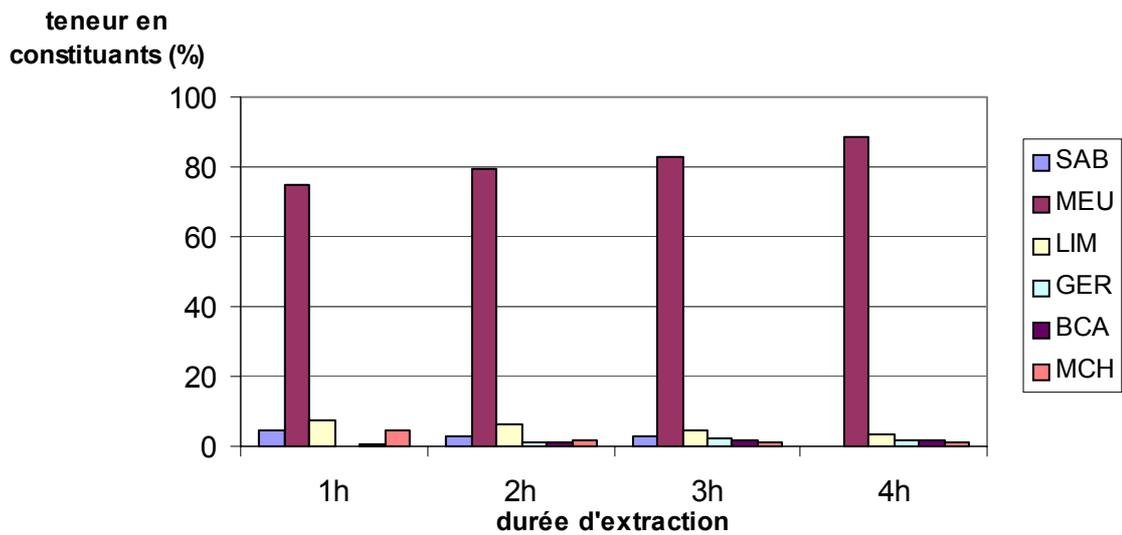


Figure 9 : Evolution des constituants chimiques de l'huile légère du groupe II durant l'extraction.

Le méthyl eugenol constitue le principal constituant chimique de l'huile légère du groupe II. En effet, sa teneur augmente suivant le temps d'extraction. Le sabinène, le méthyl-chavicol, le β -caryophyllène, le germacrène et le limonène ont des teneurs peu élevées

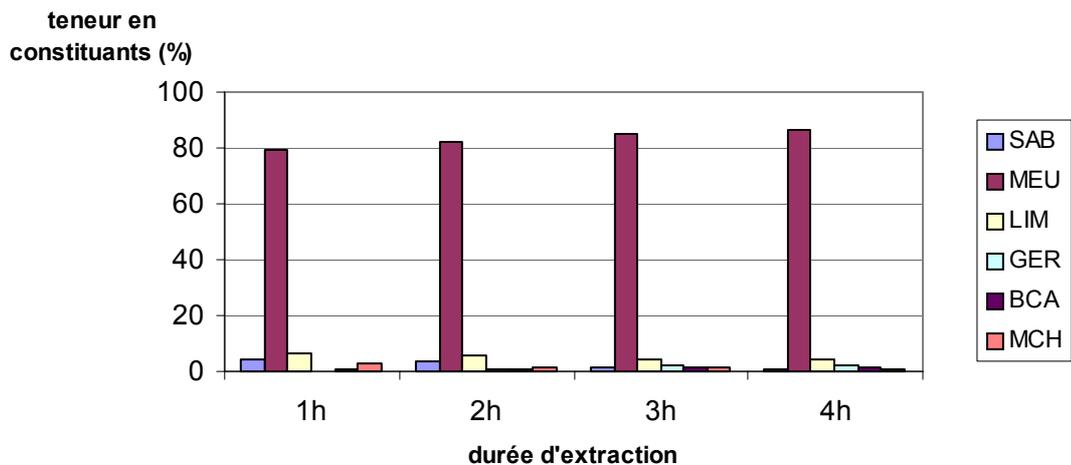


Figure 10: Evolution des constituants chimiques de l'huile lourde du groupe II durant l'extraction.

Le méthyl - eugénol représente plus de 80% des constituants chimiques de l'huile lourde du groupe II. Sa teneur augmente au cours du temps d'extraction et atteint son maximum à la troisième heure à 84.68%.

Les taux de sabinène, de limonène et de méthyl chavicol qui sont peu élevés diminuent pendant l'extraction. Ainsi, la teneur en β -caryophyllène, germacrène est très faible pendant la distillation.

Suivant la cinétique de distillation, on distingue 3 classes de constituants chimiques :

- α -pinène, γ -terpinène, β -caryophyllène, α -terpinène, germacrène D et méthyl eugénol dont la concentration est moins élevée à la première heure et augmente progressivement.
- β -pinène, sabinène, limonène, 1,8-cinéole et β -phellandrène, linalol, terpinène 4-ol et méthyl chavicol dont leur teneur diminue selon le temps d'extraction.
- Camphène, δ^3 -carène, myrcène et α -phellandrène, , cis- β -ocimène, p-cymène, terpinolène, α humulène dont leur teneur reste plus ou moins constante pendant l'extraction.

Tableau 19: Constituants majeurs de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* en fonction de la durée d'extraction (%).

Durée	Groupe I				Groupe II							
	Huile légère				Huile légère				Huile lourde			
1h	SAB	API	MEU	LIM	MEU	LIM	SAB	MCH	MEU	LIM	SAB	LIN
	38,27	9,13	8,12	6,35	74,85	7,48	4,82	4,36	79,52	6,32	4,25	4,20
2h	SAB	API	MEU	LIM	MEU	LIM	SAB	MCH	MEU	LIM	SAB	MCH
	30,01	12,72	10,74	6,28	79,52	6,47	3,11	1,98	82,26	5,77	3,38	1,52
3h	SAB	API	MEU	GER	MEU	LIM	SAB	GER	MEU	LIM	GER	BCA
	18,03	12,55	11,22	10,00	82,81	4,48	3,07	2,00	84,68	4,18	1,80	1,77

API : α -pinène

LIM : Limonène

LIN : Linalol

MCH : Méthyl chavicol

MEU : Méthyl eugénol

SAB : Sabinène

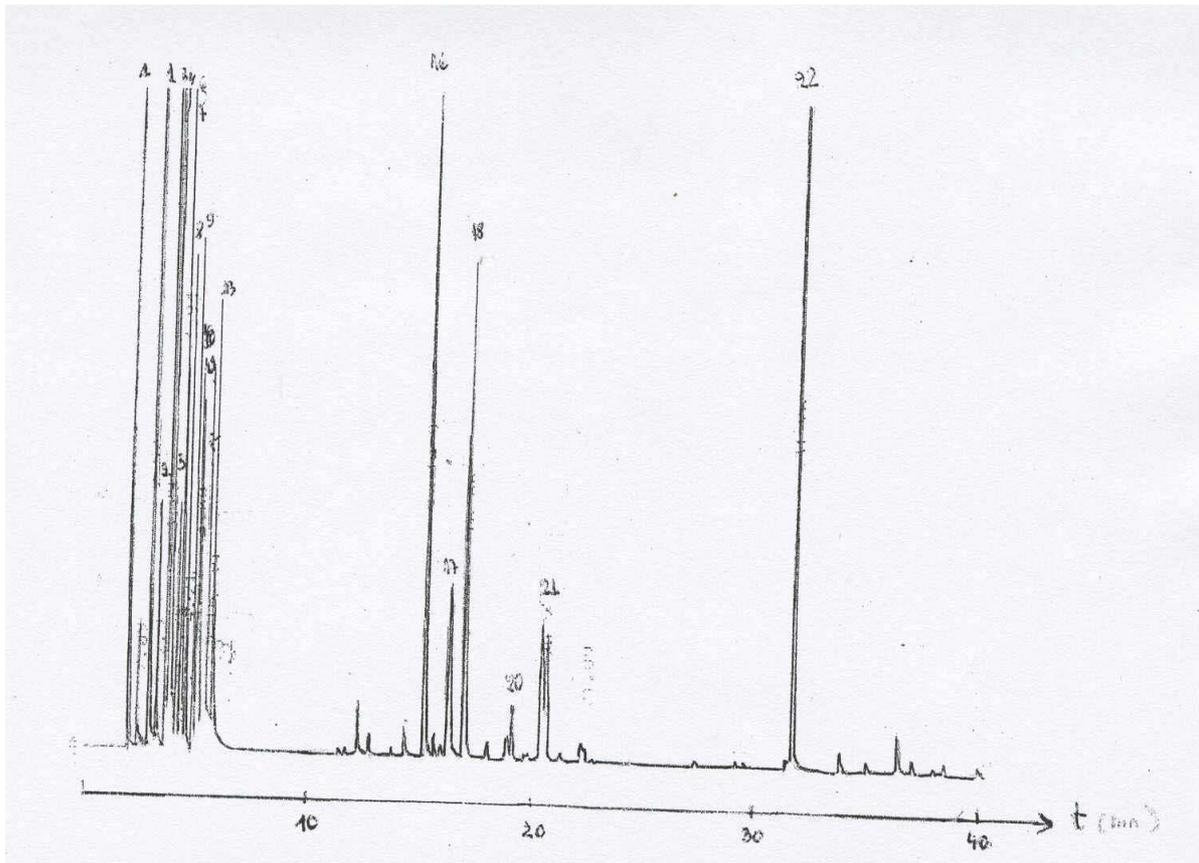


Figure 11: Chromatogramme de l'huile essentielle du groupe I à la première heure

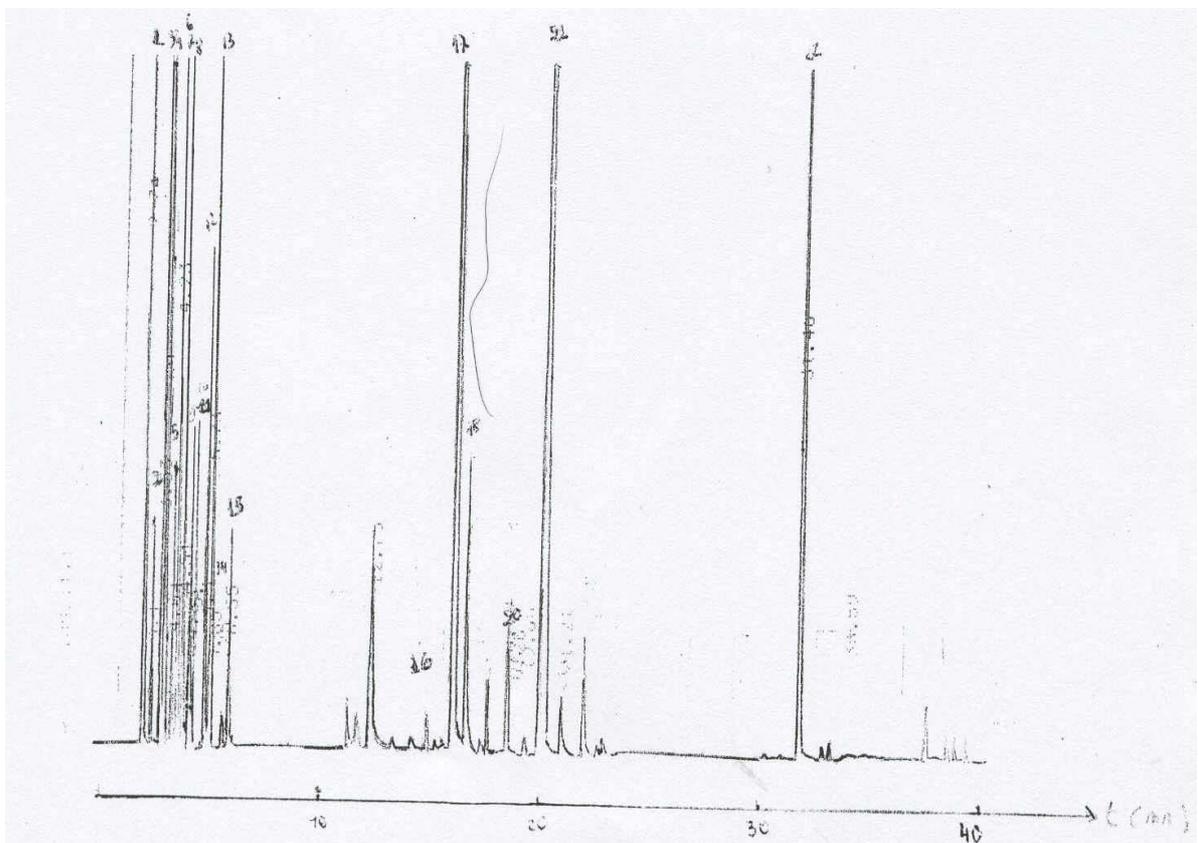


Figure 12: Chromatogramme de l'huile essentielle du groupe I à la quatrième heure

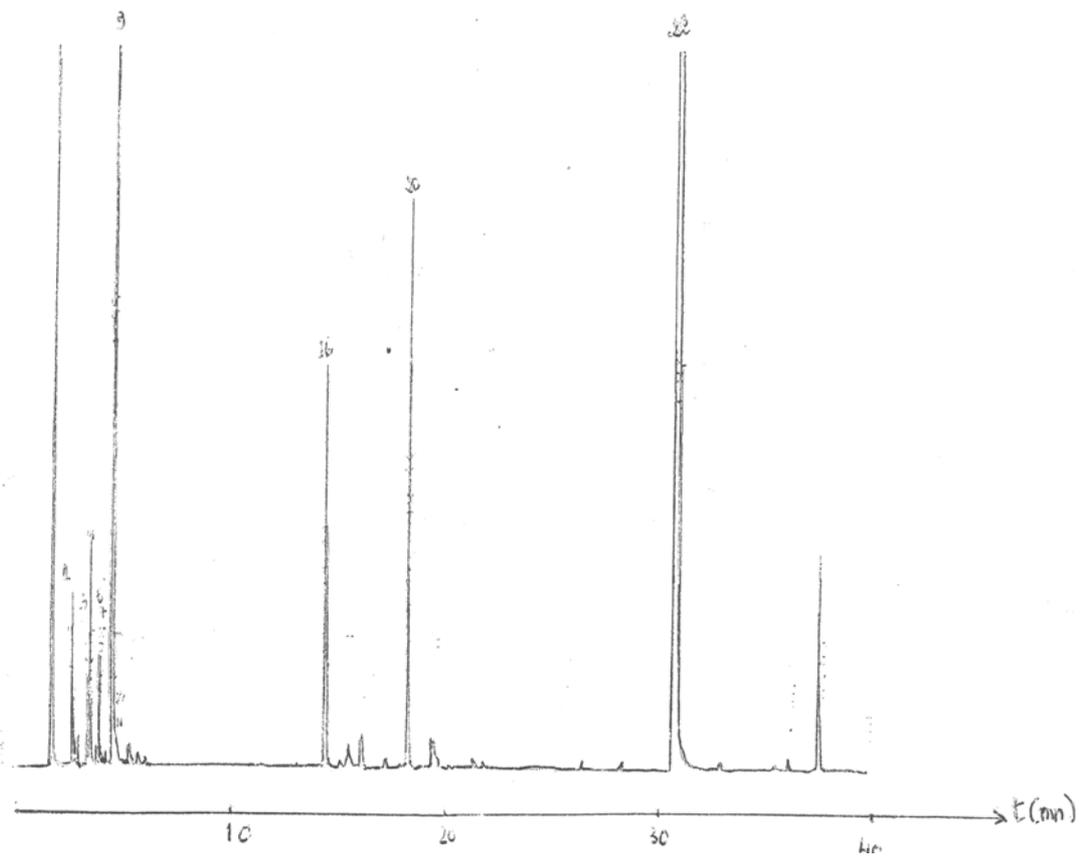


Figure 13: Chromatogramme de l'huile légère du groupe II à la première heure

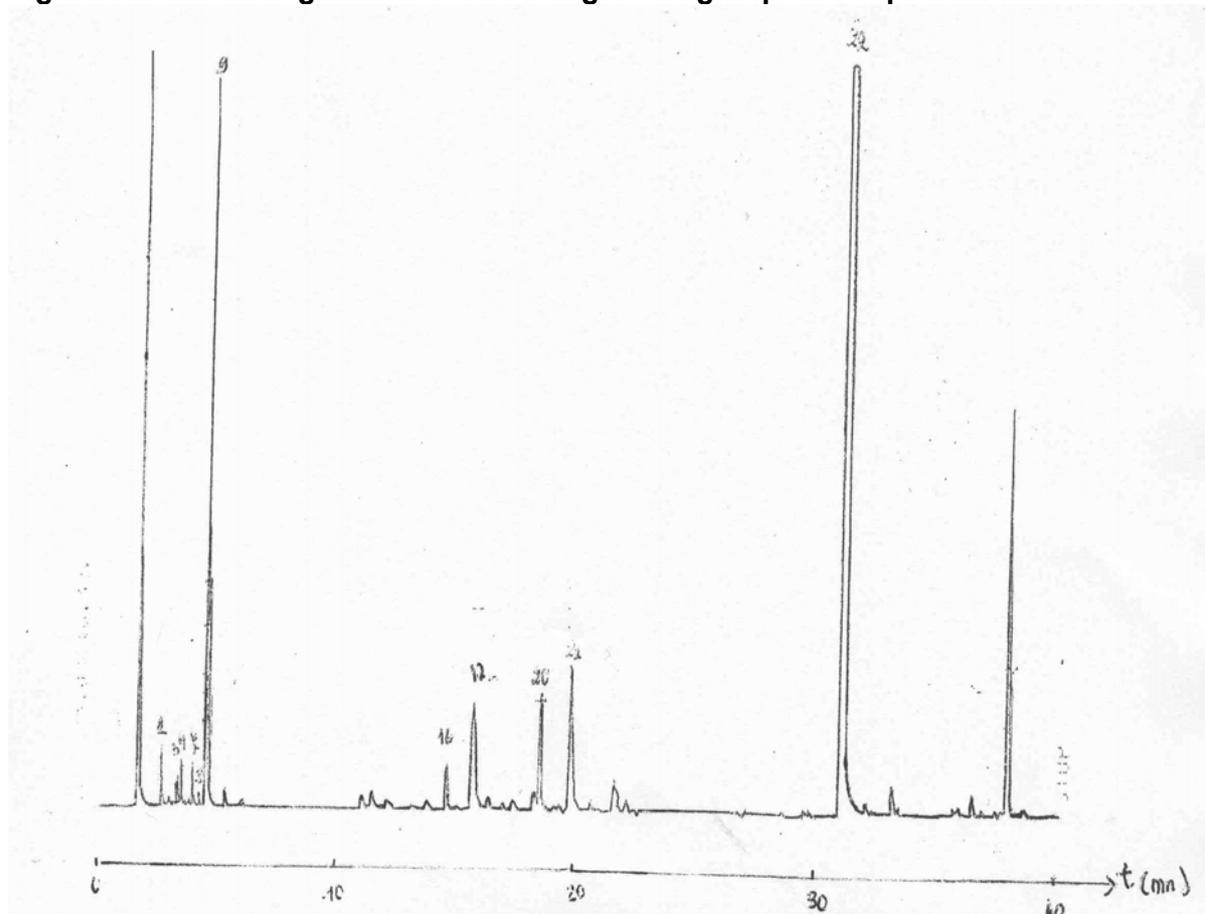


Figure 14: Chromatogramme de l'huile légère du groupe II à la quatrième heure

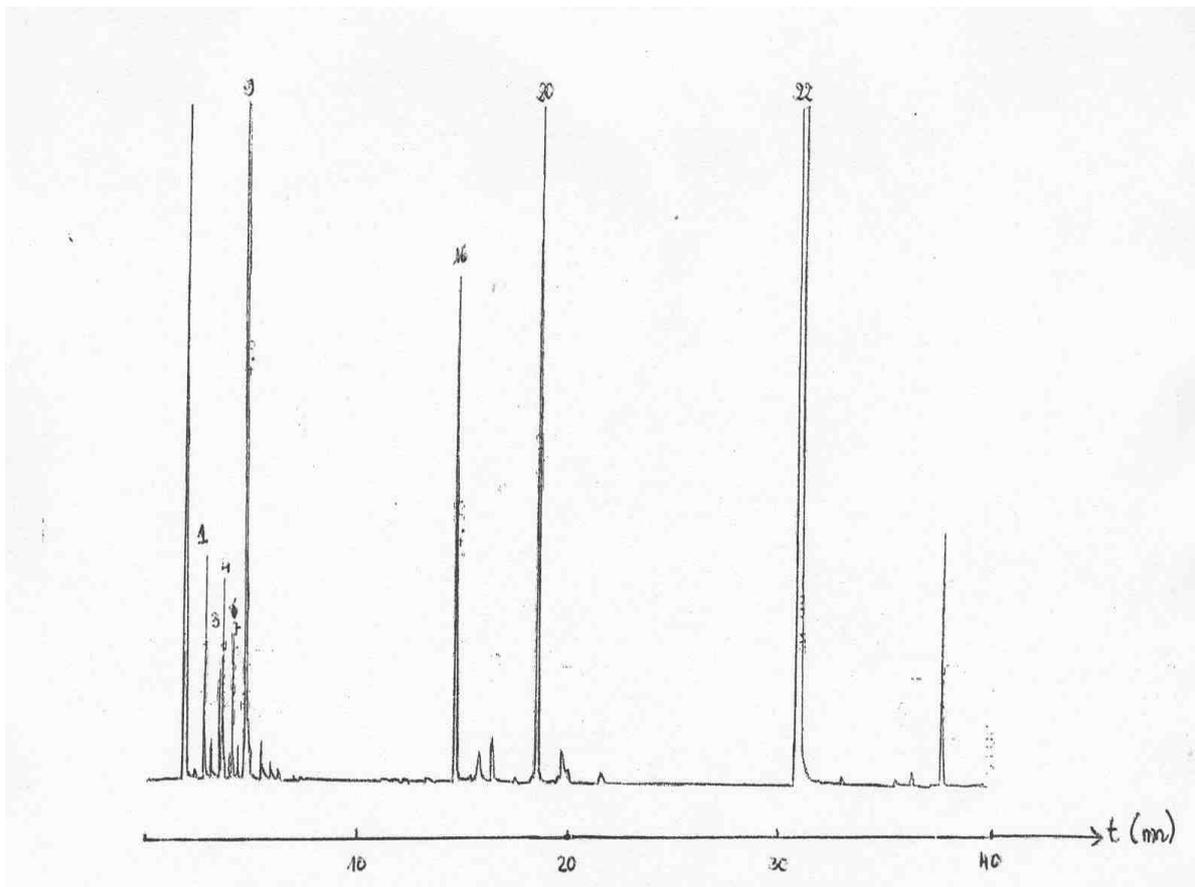


Figure 15: Chromatogramme de l'huile lourde du groupe II à la première heure

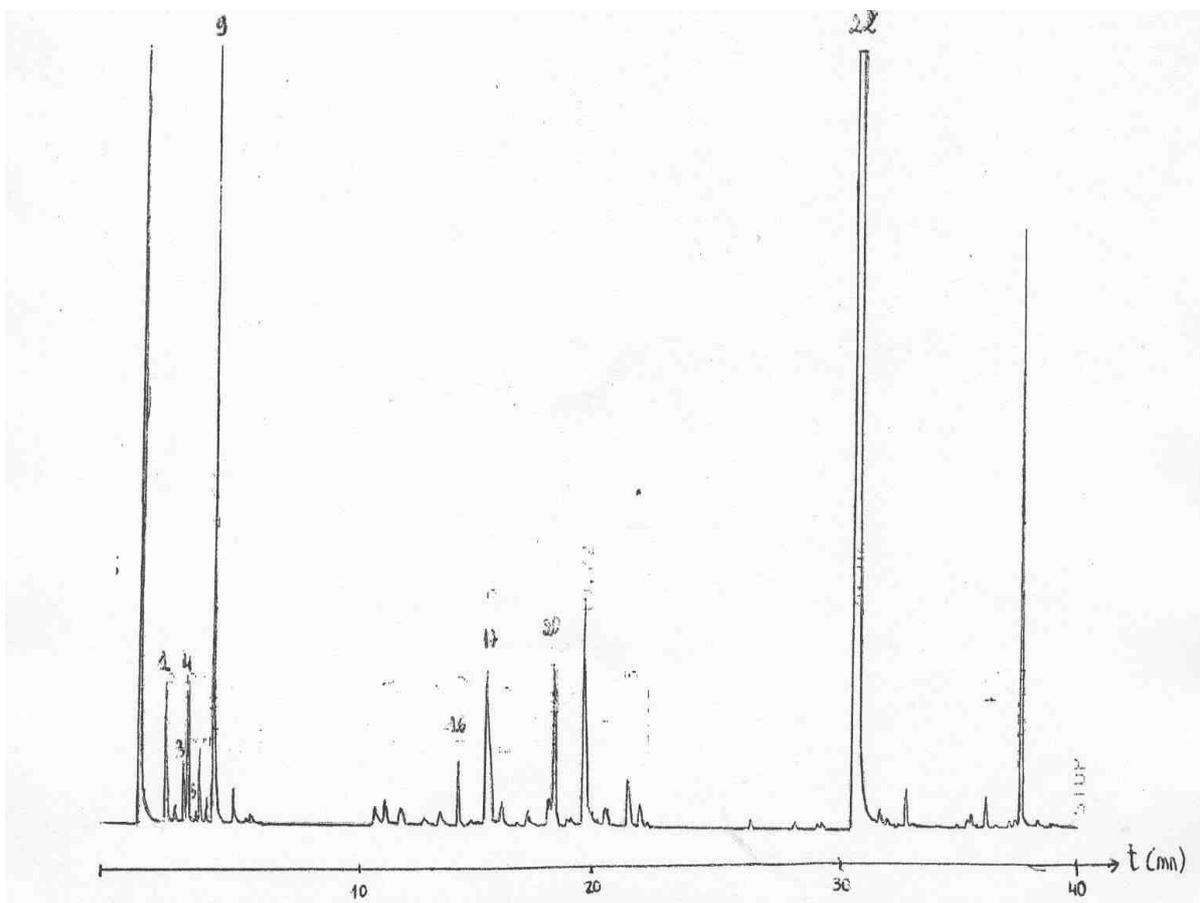


Figure 16: Chromatogramme de l'huile lourde du groupe II à la quatrième heure

III.3. Variation de l'huile essentielle suivant la durée de séchage de la matière première:

Des feuilles fraîchement cueillies, des feuilles séchées pendant 24 heures et pendant 48 heures ont été distillées. Seules les huiles essentielles du groupe II sont analysées dans cette partie. Les échantillons ont été prélevés sur un même arbre afin d'étudier l'influence des heures de séchage sur la qualité et la quantité de l'huile.

Le but de cette étude est de déterminer si on a intérêt à distiller la matière végétale immédiatement après la cueillette ou la sécher avant la distillation pour éviter la fermentation et l'évaporation de l'huile essentielle.

3.3.1. Traitement de la matière végétale :

Les feuilles sont étalées sur des sacs en plastiques et séchées à l'abri de l'air et à la lumière pour éviter de toute dégradation et pour prolonger la durée de conservation. Le séchage a aussi l'avantage de réduire la quantité de matière végétale aussi bien à distiller et pendant le transport.

Le but du séchage est d'abaisser l'humidité qui joue un rôle important dans la dégradation car la forte teneur en eau du produit entraîne :

- Le meilleur contact enzyme-substrat qui favorise les réactions de dégradation.
- La multiplication des microorganismes présents dans le produit et favorise leur activité destructrice.

Le séchage doit permettre alors à l'enlèvement partiel de l'eau contenue dans le produit afin de ralentir son métabolisme interne

Dans cette étude, on remarque qu'il y a deux types d'huiles essentielles :

- Type I : des huiles lourdes seulement sont présentes et les huiles légères ne sont que des traces.
- Type II : des huiles lourdes et légères sont présentes.

Tableau 20: Evolution de l'humidité des feuilles au cours du séchage.

	Type I			Type II	
Durée de séchage	0H	24H	48H	24H	48H
Humidité (%)	67,81	65,5	63,14	67,78	62,08

La différence de l'humidité en fonction de la durée de séchage n'est pas très significative. Même après 48 heures, le séchage n'affecte que l'évaporation de surface et une partie d'évaporation interne. Il s'agit de l'enlèvement de l'eau libre et d'une partie de l'eau liée (eau biologique).

3.3.2. Aspects physiques :

Etant donné que dans le paragraphe III.2 les aspects physiques de l'huile essentielle étudiée changent en fonction du temps d'extraction, il est à noter que le séchage de feuilles n'a pas d'influence sur l'odeur, la couleur et l'aspect limpide.

3.3.3. Teneur en huile essentielle :

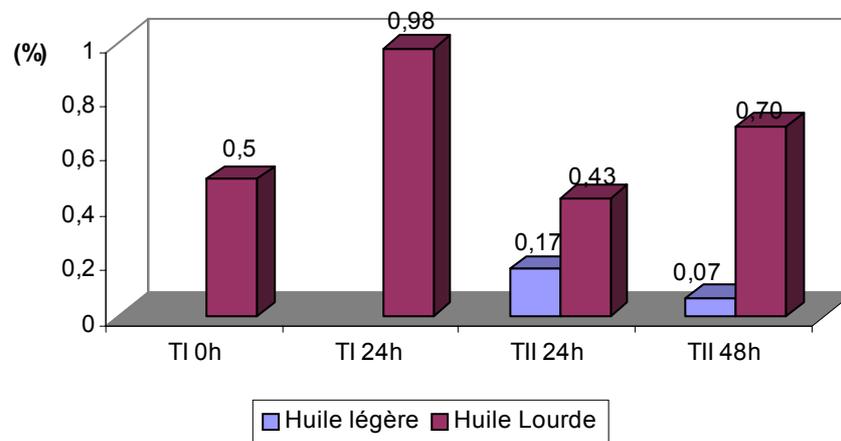
Tableau 21 : Variation du rendement en huile essentielle en (V/P) suivant la durée de séchage.

	0 h		24 h		48 h	
	rdt/Pf	rdt/Ps	rdt/Pf	rdt/Ps	rdt/Pf	rdt/Ps
type I	0,5	1,56	0,98	2,89		
type II			0,59	1,84	0,75	1,96

Rdt/Pf : Rendement (v/p) par rapport au poids frais

Rdt/Ps : Rendement (v/p) par rapport au poids sec

Les feuilles distillées sans séchage contiennent une teneur faible en huile essentielle. Ainsi, l'augmentation du rendement suivant les heures de séchages se traduit par une perte en eau de la matière végétale et par une baisse de l'humidité des feuilles par évaporation en eau.



TI 0h : huile essentielle de type I obtenue sans séchage

TI 24h : huile essentielle de type I obtenue après 24 heures de séchage

TII 24h : huile essentielle de type II obtenue après 24 heures de séchage

TII 48h : huile essentielle de type I obtenu après 48 heures de séchage

Figure 17 : Variation du rendement par rapport au poids frais en huile essentielle de type I et II en fonction de la durée de séchage.

Pour le type I, la distillation des plantes fraîchement cueillies donne un rendement en huile lourde peu élevé de l'ordre de 0.50%. Après 24 heures de séchage des feuilles, le rendement beaucoup plus élevé de 0.98% a augmenté de 96% par rapport à celui sans séchage. L'huile essentielle est obtenue donc bien plus facilement.

Après 24 heures de séchage des feuilles, l'huile légère obtenue représente 28% des huiles essentielles totales. Cette teneur devient très faible après 24 heures de plus de séchage jusqu'à 9% des huiles totales.

Concernant l'huile lourde, sa teneur augmente de 63% après 24 heures de séchage.

On admet alors que les plantes conservent les huiles essentielles qui se localisent dans les cellules.

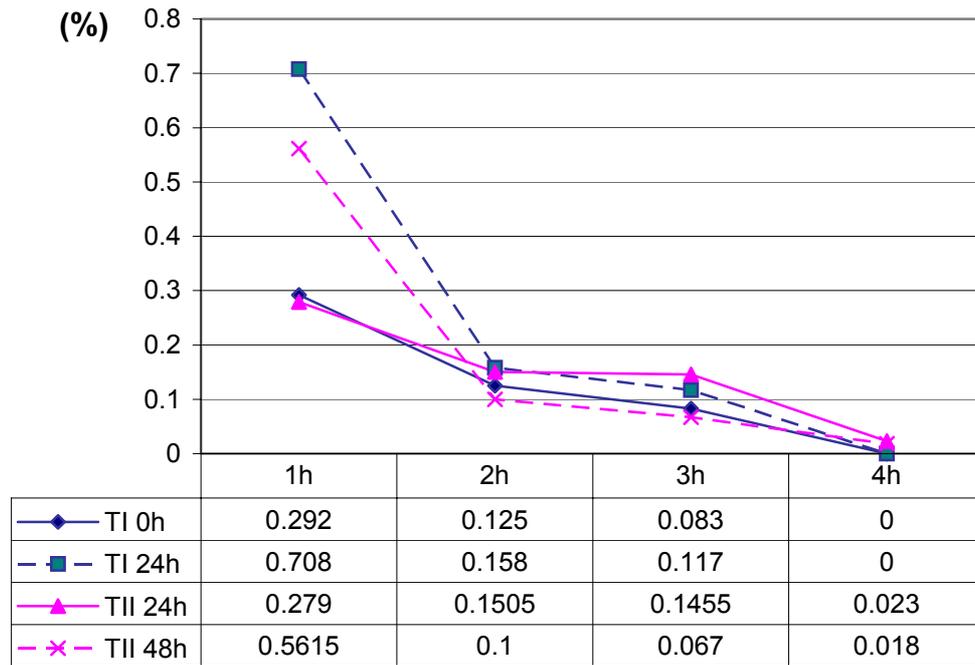


Figure 18: Evolution du rendement par heure en fonction de la durée de séchage

Le rendement en huile de type I diminue en fonction de la durée de l'extraction. Après 24 heures de séchage, cette teneur est toujours supérieure à celle obtenue sans séchage de la matière végétale.

Pour le type II, le rendement par distillation de plantes séchées pendant 48 heures est très élevé à la première heure d'extraction puis diminue rapidement.

Tableau 22: Comparaison du rendement (v/p) cumulé des huiles essentielles à partir des feuilles séchées (%).

	1h	2h	3h	4h
TI 0h	58,4	83,4	100	100
TI 24h	72,02	88,1	100	100
TII 24h	46,66	71,82	96,15	100
TII 48h	75,22	88,62	97,59	100

Pour les deux types d'huiles extraites, on obtient presque la totalité des essences à la troisième heure de distillation. Pour le type I, plus de 70 % des huiles sont récupérées dès la première heure après 48 heures de séchage. Par contre, 58% seulement sont obtenues à la première heure si les feuilles ne sont pas séchées avant la distillation.

Pour les feuilles séchées pendant 24 h, on obtient plus de 70% d'huile totale de type II à la deuxième heure d'extraction. Tandis que, dès la première heure, 75% des essences sont recueillies pour les feuilles séchées pendant 48 heures.

On admet donc qu'en fonction de la prolongation du temps de séchage de la matière végétale, l'huile essentielle est obtenue bien plus facilement et la durée de distillation sera courte.

3.3.4. Composition chimique :

C'est souvent la multiplicité des petits constituants chimiques qui définit la propriété et constitue l'efficacité d'une huile essentielle. En effet, il est important d'étudier la variation de sa composition chimique suivant la durée de séchage de la matière première.

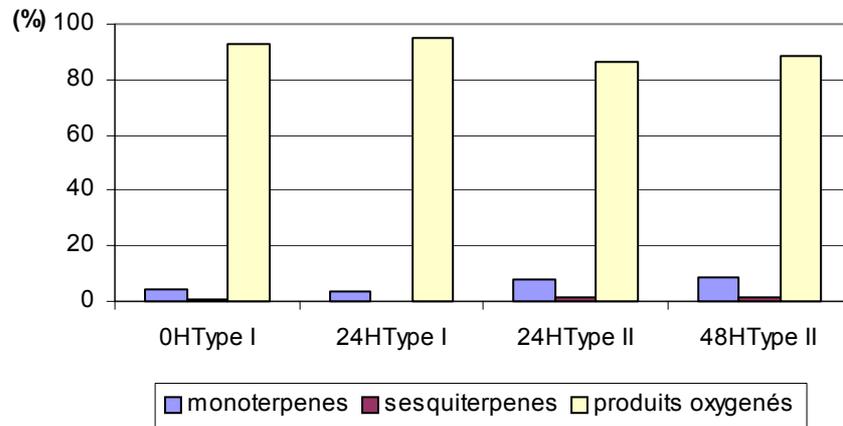


Figure 19: Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du groupe II en fonction du temps de séchage

Les huiles essentielles du groupe II sont riches en produits oxygénés même après séchage de la matière première. La concentration en hydrocarbure terpénique reste faible pendant l'extraction.

Tableau 23 : Comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle du groupe II en fonction du temps de séchage. (%)

Durée de séchage	Type I		Type II	
	0H	24H	24H	48H
Monoterpenes	4,2	3,86	8,085	8,463
Sesquiterpenes	1,06	0	1,2895	1,342
Produits oxygénés	92,979	95,056	86,076	88,2605
Valeur du Chi2	1,11		0,01	
Valeur du Chi2 (5%)	5,99		5,99	

Les différences observées en fonction du séchage donnent des valeurs de chi2 de 1,11 pour les huiles essentielles du type I et de 0.01 pour celles du type II. Or au risque de 5%, la valeur max que peut prendre le chi2 est de 5.99 avec un degré de liberté de 2. Comme les valeurs du chi2 sont inférieures à 5,99, on ne peut pas rejeter l'hypothèse d'indépendance au risque de 5%.

On peut alors conclure qu'au risque de 5%, il n'y a pas de différence significative de composition chimique en fonction de la durée de séchage.

3.3.4.1. Hydrocarbures terpéniques :

Les tableaux 24 et 26 représentent la liste des composés en hydrocarbures terpéniques qui doit mettre en relief les différences entre les huiles essentielles produites à partir des feuilles séchées et celles provenant de feuilles fraîches.

Tableau 24: Comparaison de la fraction des hydrocarbures terpéniques de l'huile essentielle du groupe II en fonction de la durée de séchage des feuilles. (%)

Constituant	Type I		Type II	
	0H	24H	24H	48H
camphène	tr	tr	tr	tr
δ3-carène	tr	tr	tr	tr
p-cymène	tr	tr	tr	tr
limonène	79,85	100,00	60,19	35,33
myrcène+ α -phellandrène	tr	tr	tr	2,75
cis- β ocimène	tr	tr	tr	tr
α-pinène	tr	tr	4,01	12,73
β-pinène	tr	tr	tr	2,95
sabinène	tr	tr	22,04	29,83
α -terpinène	tr	tr	tr	tr
γ-terpinène	tr	tr	tr	2,72
terpinolène	tr	tr	tr	tr
β -caryophyllène	20,15	tr	4,66	tr
germacrène-D	tr	tr	9,10	13,69
α -humulène	tr	tr	tr	tr
Valeur du Chi2	22.41		26.14	
Valeur du Chi2 (5%)	3.84		14.1	
Degré de liberté	1		7	

D'après ce tableau, nous constatons que les constituants majeurs des hydrocarbures des huiles du groupe II ne changent pas suivant la durée de séchage de la matière végétale. Pour les huiles du type I, le limonène reste le principal constituant des hydrocarbures terpéniques tandis que pour les huiles du type II ce sont le limonène, le sabinène et le germacrène-D.

Pour les deux types d'huile essentielle, on a calculé la valeur du chi2 sous l'hypothèse d'indépendance avec un risque de 5%. Les valeurs de chi2 observées de 22,41 pour le type I et de 26,14 pour le type II sont supérieures à celles de chi2 à 5% (3.84 et 14.1). On peut conclure donc au rejet de l'hypothèse d'indépendance. Les données permettent de contredire cette hypothèse et on affirme au risque de 5% que la teneur de la fraction des hydrocarbures dépend de la durée de séchage de la matière première. Ce qui signifie que le séchage des feuilles avant la distillation a une influence sur la fraction des hydrocarbures terpéniques. Pour les huiles essentielles de type I, on constate que la teneur relative en limonène augmente après 24 heures de séchage de feuilles et celle en β -caryophyllène diminue. Pour les huiles de type II, on considère une augmentation de la teneur en sabinène et en germacrène-D et une diminution de la teneur en sabinène.

3.3.4.2. Produits oxygénés :

Les constituants des produits oxygénés des huiles du groupe II sont représentés dans le tableau 25.

Tableau 25 : Constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle du groupe II. (%)

Constituant	Type I		Type II	
	0H	24H	24H	48H
linalol	7,53	6,46	2,51	1,66
1,8-cinéole	tr	tr	tr	tr
β -phellandrène	tr	tr	tr	tr
Met-chavicol	1,99	1,76	4,05	3,16
méthyl eugénol	90,48	91,78	92,79	94,15
terpinène-4 ol	tr	tr	0,66	1,03
Valeur du Chi2	0.085		0.390	
Valeur du Chi2 (5%)	5.99		7.81	

D'après ce tableau, on admet que le méthyl eugénol constitue le principal constituant des produits oxygénés des huiles essentielles du groupe II même après de séchage des feuilles. Sa teneur constitue plus de 90% des produits oxygénés.

D'après le calcul statistique, la différence observée sur les huiles essentielles donne des valeurs de chi2 de 0.085 pour le type I et de 0.390 pour le type II. On s'aperçoit que ces valeurs sont inférieures à celles de chi2 au risque de 5% (5.99 et 7.81). On peut conclure au non-rejet de l'hypothèse d'indépendance.

On admet donc au risque de 5% que la teneur relative de la fraction des produits oxygénés ne dépend pas de la durée de séchage de la matière première.

Ainsi, les constituants majeurs de l'huile essentielle par ordre décroissant restent les mêmes après séchage de la matière première. Pour le type I, il s'agit des méthyl eugénol, linalol et méthyl chavicol. Pour le type II, ce sont les méthyl eugénol, méthyl chavicol et linalol.

Tableau 26 : Composition chimique des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* suivant la durée de séchage. (%)

Constituant	Type I		Type II	
	0H	24H	24 H	48 H
α -pinène	tr	tr	0,38	1,25
camphène	tr	tr	tr	tr
β -pinène	tr	tr	tr	0,29
Sabinène	tr	tr	2,07	2,92
d3-carène	tr	tr	tr	tr
Myrcène+ α phellandrène	tr	tr	tr	0,27
α -terpinène	tr	tr	tr	tr
Limonène	4,20	3,86	5,64	3,46
1,8-cinéole	tr	tr	tr	tr
β -phellandrène	tr	tr	tr	tr
cis- β ocimène	tr	tr	tr	tr
γ -terpinène	tr	tr	tr	0,27
p-cymène	tr	tr	tr	tr
terpinolène	tr	tr	tr	tr
Linalol	7,00	6,14	2,16	1,47
β -caryophyllène	1,06	tr	0,44	tr
terpinène-4 ol	tr	tr	0,57	0,91
α -humulène	tr	tr	tr	tr
Met-chavicol	1,85	1,68	3,48	2,79
germacrène-D	tr	tr	0,85	1,34
méthyl eugénol	84,13	87,24	79,87	83,10

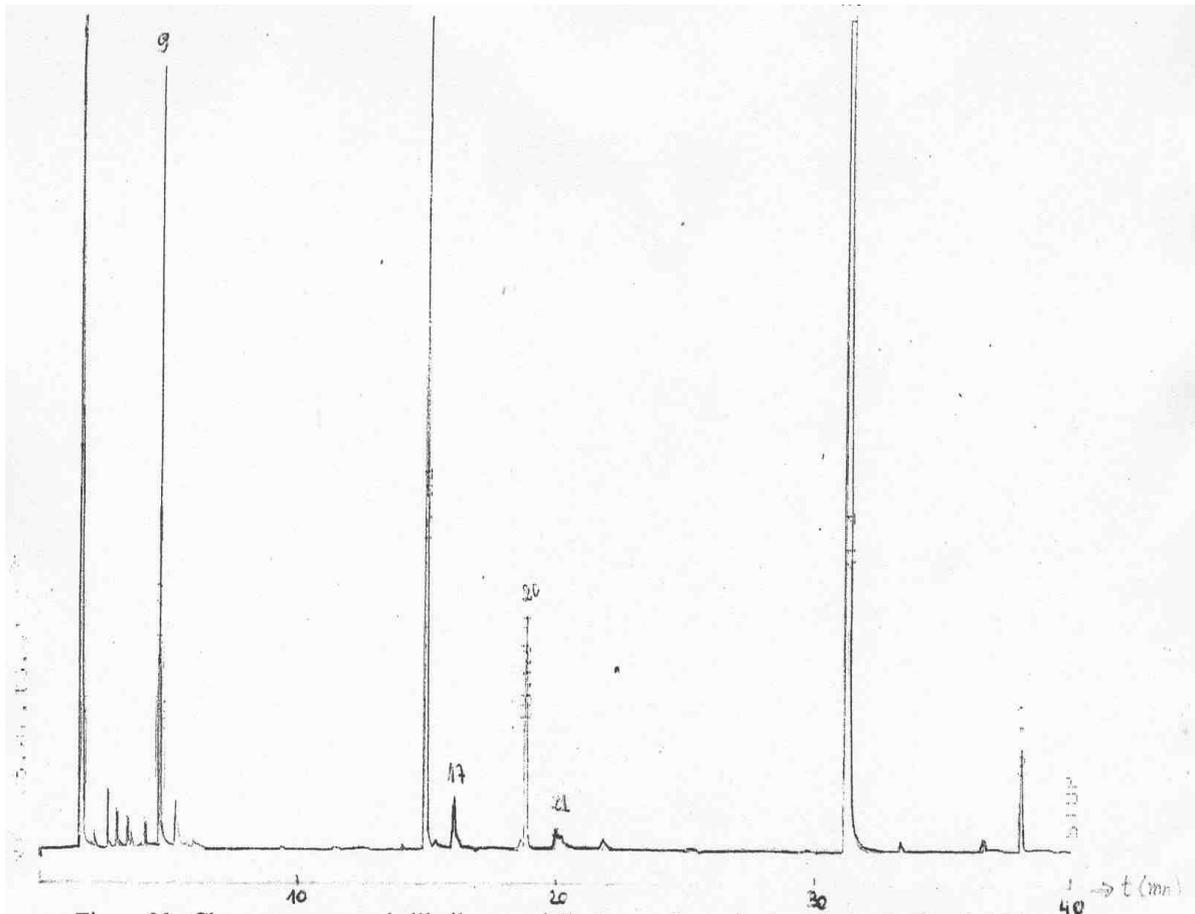


Figure 20: Chromatogramme de l'huile essentielle de type I extraite à partir des feuilles fraîches

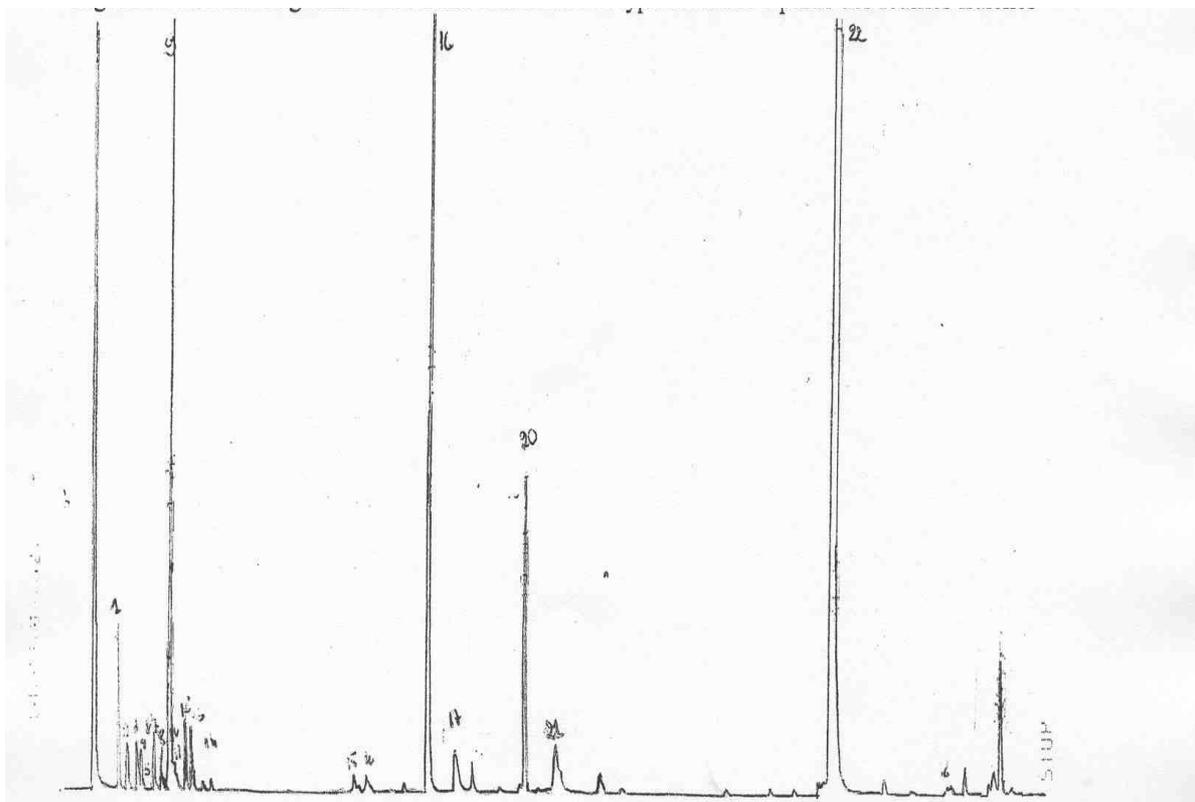


Figure 21 : Chromatogramme de l'huile essentielle de type I extraite à partir des feuilles séchées pendant 24 heures

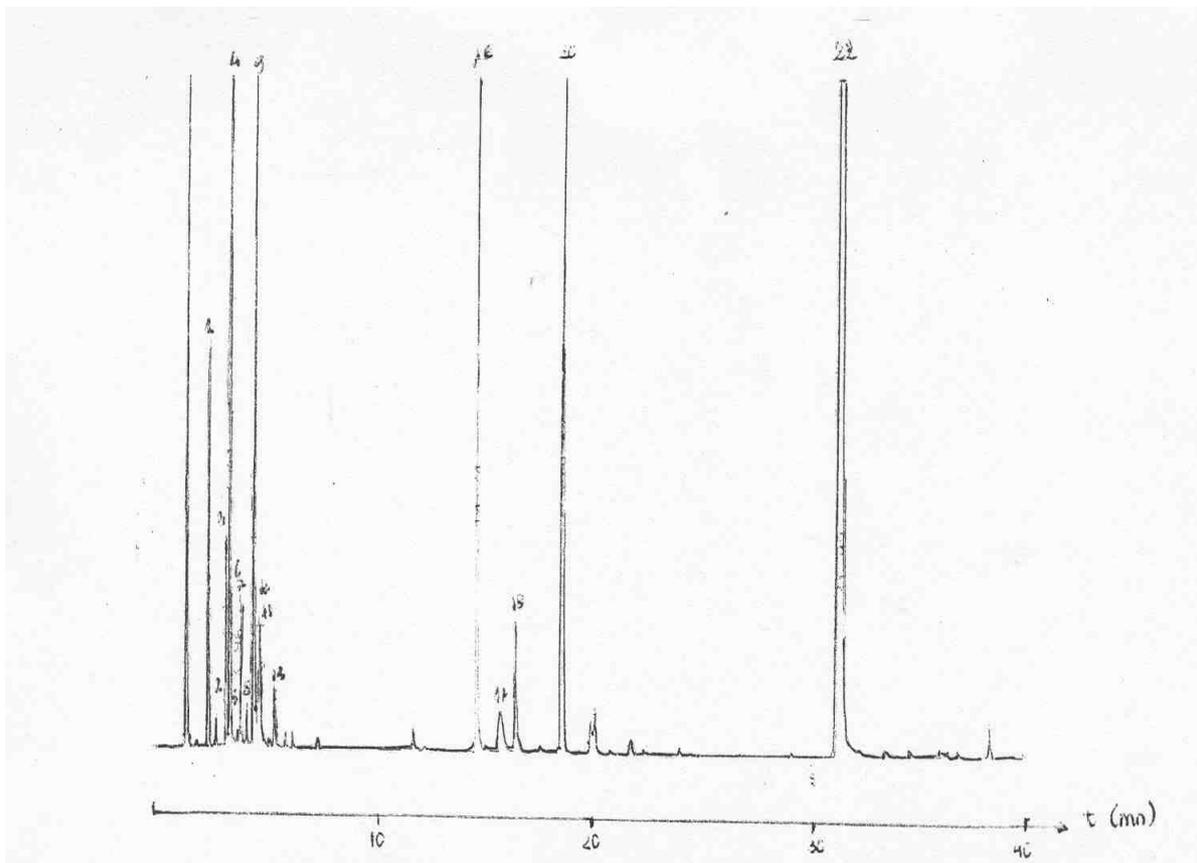


Figure 22: Chromatogramme de l'huile essentielle de type II extraite à partir des feuilles séchées pendant 24 heures

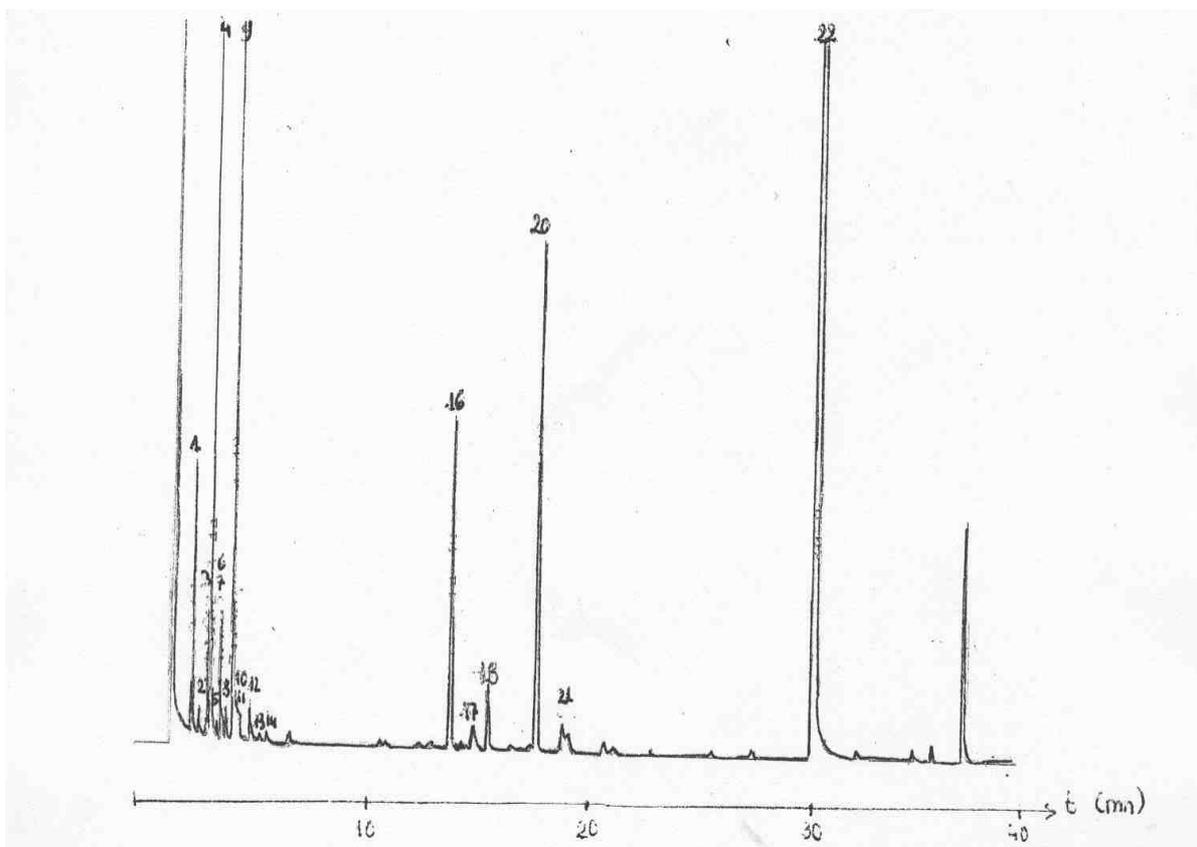


Figure 23: Chromatogramme de l'huile essentielle de type II extraite à partir des feuilles séchées pendant 48 heures

III.4. Etude de la variabilité individuelle de *Ravensara aromatica* et détermination des facteurs influençant la quantité et la qualité de l'huile essentielle :

Cette étude a été effectuée sur 6 arbres différents répartis dans 3 régions de Betanimainty. Les huiles essentielles étudiées sont extraites après 24 heures de séchage naturel.

Le but de ce paragraphe est de déterminer la variabilité individuelle de chaque arbre et de détecter les facteurs susceptibles d'influer sur la qualité et la quantité des huiles essentielles. Il s'agit des facteurs biologiques (hauteur et diamètre de l'arbre, la durée d'exposition à la lumière des feuilles, présence des espèces environnantes), géographiques (position topographique, altitude)

Tableau 27: Caractéristiques des 6 arbres

Arbre	2	3	4	1	5	6
Région	Besakay	Amparihibe	Amparihibe	Besakay	Bemanja	Bemanja
Altitude (m)	1053	1070	1079	1069	1040	1080
Hauteur (m)	16	17	15	20	12	18
Diamètre (cm)	23	17	20	30	20	34.5
Position du pied	1	1	2	2	2	2
Forme du houppier	2	2	2	2	2	2
Forme du fût	3	1	4	2	2	2

3.4.1. Aspects physiques :

Tableau 28: Aspects physiques de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica*

Arbre	1	2	3	4	5	6
Aspect	Liquide mobile					

Selon les critères organoleptiques, une nette différence observée sur les 6 échantillons observés permet de les séparer en 2 groupes : arbre n°1,5, 6 et 2, 3, 4.

Il est à noter dans les paragraphes III.2 que les aspects physiques ne varient pas en fonction de la durée de distillation et de la durée de séchage de la matière première.

On admet donc que la qualité organoleptique est déterminée par la production d'huile légère et d'huile lourde au cours de la distillation.

3.4.2. Teneur en huile essentielle :

Le rendement de l'extraction par rapport au poids frais en huile essentielle des 6 arbres étudiés est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 29 : Rendement en huile essentielle des 6 arbres

N° de l'arbre	1	2	3	4	5	6
Région de collecte	Besakay	Besakay	Amparihibe	Amparihibe	Bemanja	Besakay
Rdt %	0,98	0,90	0,80	0,85	0,60	0,59

Le rendement présente une différence significative pour les 6 échantillons étudiés. Les échantillons 2, 3 et 4 ont un rendement élevé de l'ordre de 0,80 à 0,98.

En effet, le rendement est maximal pour l'échantillon 1 obtenu après 24 heures de séchage où on signale la présence d'huile lourde uniquement. Par contre, pour 2, 3 et 4 il n'y a que de l'huile légère uniquement. Le rendement est moins élevé pour 5 et 6 où on note la présence d'huiles légère et lourde au cours de la distillation.

3.4.3. Composition chimique :

La connaissance de la composition chimique de l'huile essentielle nous permet de maîtriser la qualité, de déterminer la variabilité individuelle et leur facteur de variation.

Dans ce paragraphe, la conduite du test se fait comme suit :

- On pose l'hypothèse d'indépendance ; c'est à dire qu'il n'y a pas de différence entre les arbres de *Ravensara aromatica* pour la composition chimique de l'huile essentielle.
- On définit le risque ici à 5%
- C'est à partir de la valeur de chi-2 qu'on accepte ou non l'hypothèse de départ.

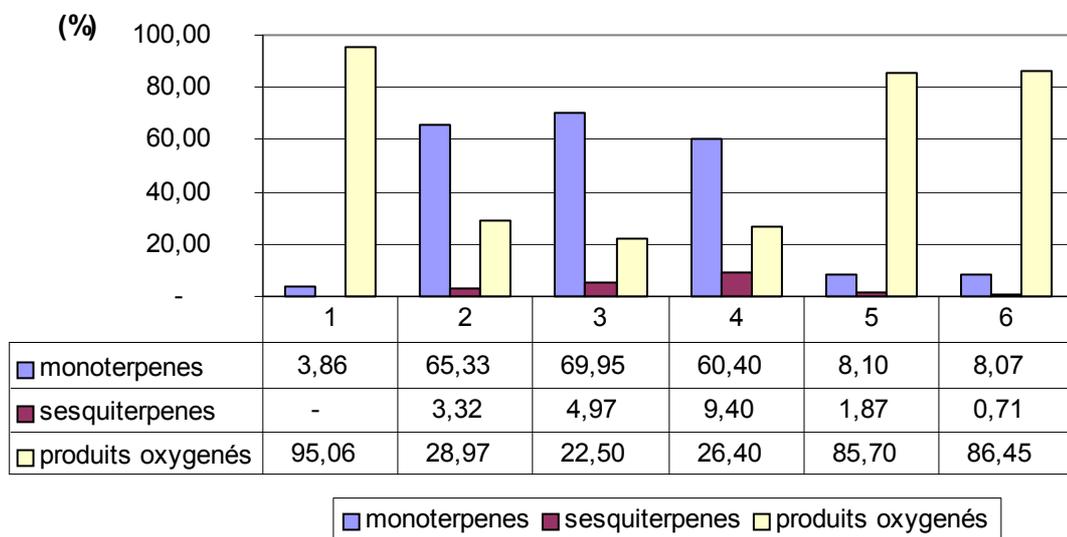


Figure 24: Composition chimique des 6 échantillons obtenus sur les 6 arbres

D'après ce graphe, on observe une différence de composition chimique des échantillons provenant de 6 distillations analysées :

- 2, 3, 4 sont riches en hydrocarbures terpéniques. Les produits oxygénés renferment moins de 30% de l'huile essentielle.
- Pour 1, 5 et 6 les produits oxygénés constituent 90 à 96% de l'huile essentielle

Par calcul statistique, on a les résultats suivants :

Chi-2	degré de liberté	Chi-2 (5%)
275,35	10	18,3

La valeur observée de Chi-2 de 275,35 est supérieure à 18,3, on rejette donc l'hypothèse d'indépendance au risque de se tromper de 5%. On peut affirmer qu'on a observé des différences de la composition chimique de l'huile essentielle entre les 6 arbres étudiés de *Ravensara aromatica*.

On poursuit donc l'étude en essayant de confirmer l'hypothèse des deux populations de *Ravensara aromatica* produisant 2 groupes d'huiles essentielles.

Tableau 30: Composition chimique des deux groupes d'huiles essentielles (%).

N° de l'arbre	Population I			Population II		
	2	3	4	1	5	6
<i>monoterpenes</i>	65,33	69,95	60,40	3,86	8,10	8,07
sesquiterpenes	3,32	4,97	9,40	tr	1,87	0,71
produits oxygenés	28,97	22,50	26,40	95,06	85,70	86,45
Chi-2	5,01			4,42		
Degré de liberté	4			4		
Chi-2 (5%)	9,49			9,49		

D'après ces résultats statistiques, les valeurs de chi-2 observées pour les deux populations de *Ravensara aromatica* sont de 5,01 et 4,42 soient des valeurs inférieures à 9,49 (chi-2 au risque de 5%). On peut alors affirmer qu'au risque de 5% on n'a pas observé de différence significative de composition chimique entre les arbres 2, 3 et 4 pour la population I et entre les arbres 1, 5, 6 pour la population II.

3.4.3.1. Population I :

a) *Hydrocarbures terpéniques* :

L'étude de la fraction des hydrocarbures terpéniques est consacrée à la détermination de la variabilité individuelle de l'arbre entre chaque groupe.

Tableau 31: Comparaison de la fraction des hydrocarbures terpéniques sur les arbres 2, 3, 4 (%)

N° de l'arbre	2	3	4
camphène	0,65	1,50	1,53
δ3-carène	1,17	2,60	1,41
p-cymène	0,51	1,61	0,74
limonène	2,36	19,44	3,22
myrcène+ α -phellandrène	6,21	8,55	6,76
cis- β ocimène	0,82	1,67	2,96
α-pinène	14,58	12,42	12,78
β-pinène	6,50	5,73	5,71
sabinène	56,91	32,66	43,75
α -terpinène	1,84	2,33	3,00
γ-terpinène	2,97	3,98	3,85
terpinolène	0,64	0,87	0,85
β -caryophyllène	1,23	1,15	7,25
germacrène-D	3,61	4,99	5,54
α -humulène	tr	0,49	0,66
Total	100	100	100
Chi-2	41,77		
Degré de liberté	28		
Chi-2 (5%)	41,3		

On a calculé la valeur de chi-2 sous l'hypothèse d'indépendance avec un risque de 5%. D'après le calcul statistique, l'hypothèse de départ est fautive car la valeur de chi-2 observée est supérieure au seuil au risque de 5%. On peut conclure que la teneur de la fraction des hydrocarbures terpéniques est différente entre les arbres 2, 3 et 4 produisant des huiles essentielles de groupe I.

En effet, on observe que les majeurs constituants de l'huile essentielle par ordre décroissant ne sont pas les mêmes pour ces 3 arbres.

- Arbre 2 : sabinène, α -pinène et myrcène+ α -phellandrène
- Arbre 3 : sabinène, limonène et α -pinène
- Arbre 4 : sabinène, α -pinène et β -caryophyllène

b) *Produits oxygénés :*

Tableau 32: Comparaison de la fraction des produits oxygénés sur les arbres 2, 3 et 4 (%).

	2	3	4
linalol	8,00	36,05	25,78
1,8-cinéole+b-phellandrène	14,42	23,64	15,11
Met-chavicol	2,64	tr	2,24
méthyl eugénol	62,75	10,63	39,52
terpinène-4 ol	12,19	29,67	17,36
Chi-2	67,17 > 15.5		
Degré de liberté	8		

Etant la valeur de chi-2 observée est supérieure à 15.5, on admet donc qu'il y a une différence de la fraction des produits oxygénés entre les arbres 2, 3 et 4.

De plus, les constituants majoritaires en produits oxygénés sont différents pour les 3 arbres :

- Arbre 2 : Méthyl eugénol, 1,8-cinéole + β -phellandrène et terpinène-4ol
- Arbre 3 : linalol, terpinène-4ol et 1,8-cinéole + β -phellandrène
- Arbre 4 : Méthyl eugénol, linalol et terpinène-4ol

3.4.3.2. Population II :

a) *Hydrocarbures terpéniques :*

Tableau 33: Comparaison de la fraction des hydrocarbures terpéniques sur les arbres 1, 5 et 6 (%).

N° de l'arbre	1	5	6
camphène	tr	tr	tr
δ^3 -carène	tr	tr	tr
p-cymène	tr	tr	tr
limonène	100,00	32,24	91,90
myrcène+ α -phellandrène	tr	tr	tr
cis- β ocimène	tr	tr	tr
α -pinène	tr	7,55	tr
β -pinène	tr	tr	tr
sabinène	tr	41,48	tr
α -terpinène	tr	tr	tr
γ -terpinène	tr	tr	tr
terpinolène	tr	tr	tr
β -caryophyllène	tr	8,76	tr
germacrène-D	tr	9,98	8,10
α -humulène	tr	tr	tr
Chi-2	161.56 > 41.3		
Degré de liberté	28		

Ce tableau montre que la valeur de chi-2 observée est supérieure à celle de chi-2 au risque de 5%. On peut donc conclure au rejet de l'hypothèse d'indépendance. On affirme donc au risque de 5% que la teneur de la fraction des hydrocarbures terpéniques est différente entre les arbres 1, 5 et 6.

Ainsi, les produits majoritaires de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* ne sont pas les mêmes pour chaque arbre :

- Arbre 1 : le limonène constitue la totalité de la fraction des hydrocarbures
- Arbre 5 : sabinène, limonène et germacrène-D
- Arbre 6 : limonène et germacrène-D

b) *Composés oxygénés :*

Tableau 34: Comparaison de la fraction des produits oxygénés sur les arbres 1, 5 et 6 (%).

	1	5	6
linalol	6,46	2,95	2,06
1,8-cinéole+β-phellandrène	tr	tr	tr
Methyl-chavicol	1,76	4,88	3,22
méthyl eugénol	91,78	90,84	94,72
terpinène-4 ol	tr	1,33	tr
Chi-2	7,04 < 15,5		
Degré de liberté	8		

Le chi-2 calculé est de 7.04 qui est inférieure à 15,5, on peut donc conclure qu'il n'y a pas de différence de composition en fraction des produits oxygénés entre les arbres 1, 5 et 6 au risque de 5%.

Tableau 35: Comparaison des deux populations de *Ravensara aromatica*

Population I		Population II	
Arbres 2, 3 et 4		Arbres 1, 5 et 6	
Résultats observés par le test chi-2	Conclusion	Résultats observés par le test chi-2	Conclusion
Pas de différence sur la teneur en monoterpène, sesquiterpène et produits oxygénés	Population unique	Pas de différence sur la teneur en monoterpène, sesquiterpène et produits oxygénés	Population unique
Différence significative sur la fraction des hydrocarbures	Ces différences sont dues à des facteurs influençant la qualité de l'huile essentielle (biologiques, climatiques,...)	Différence significative sur la fraction des hydrocarbures	Ces différences sont dues à des facteurs influençant la qualité de l'huile essentielle (biologiques, climatiques,...)
Différence significative sur la fraction des produits oxygénés		Pas de différence sur la fraction des produits oxygénés	

On peut conclure qu'il existe deux populations de *Ravensara aromatica* produisant deux groupes d'huile essentielle à profil chimique différent dans la forêt de Betanimainty :

- Arbres 2, 3 et 4 produisant des huiles essentielles du groupe I constituées principalement de sabinène
- Arbres 1, 5 et 6 produisant des huiles essentielles du groupe II riche en méthyl eugénol qui sont distinguées en deux types suivant la présence des huiles légères et des huiles lourdes.
 - Type I : des huiles lourdes seulement sont présentes et les huiles légères ne sont que des traces.
 - Type II : des huiles lourdes et légères sont présentes.

En effet, l'étude des facteurs influençant la qualité de l'huile essentielle s'avère impossible car l'effectif de la population est peu nombreux.

Tableau 36 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* venant de 6 arbres différents (%).

N° de l'arbre	1	2	3	4	5	6
α-pinène	tr	10,01	9,30	8,92	0,75	tr
camphène	tr	0,45	1,13	1,07	tr	tr
β-pinène	tr	4,47	4,29	3,98	tr	tr
Sabinène	tr	39,07	24,47	30,54	4,13	tr
δ ³ -carène	tr	0,80	1,95	0,99	tr	tr
Myrcène+α-phellandrène	tr	4,26	6,41	4,72	tr	tr
α-terpinène	tr	1,26	1,74	2,09	tr	tr
Limonène	3,86	1,62	14,56	2,25	3,21	8,07
1,8-cinéole+ β-phellandrène	tr	4,18	5,32	3,99	tr	tr
cis- β ocimène	tr	0,56	1,25	2,07	tr	tr
γ-terpinène	tr	2,04	2,98	2,69	tr	tr
p-cymène	tr	0,35	1,21	0,52	tr	tr
terpinolène	tr	0,44	0,66	0,59	tr	tr
Linalol	6,14	2,32	8,11	6,81	2,53	1,78
β-caryophyllène	tr	0,85	0,86	5,06	0,87	tr
terpinène-4 ol	tr	3,53	6,68	4,58	1,14	tr
α-humulène	tr	tr	0,37	0,46	tr	tr
Methyl-chavicol	1,68	0,76	tr	0,59	4,18	2,79
germacrène-D	tr	2,48	3,74	3,87	0,99	0,71
méthyl eugénol	87,24	18,18	2,39	10,43	77,85	81,88

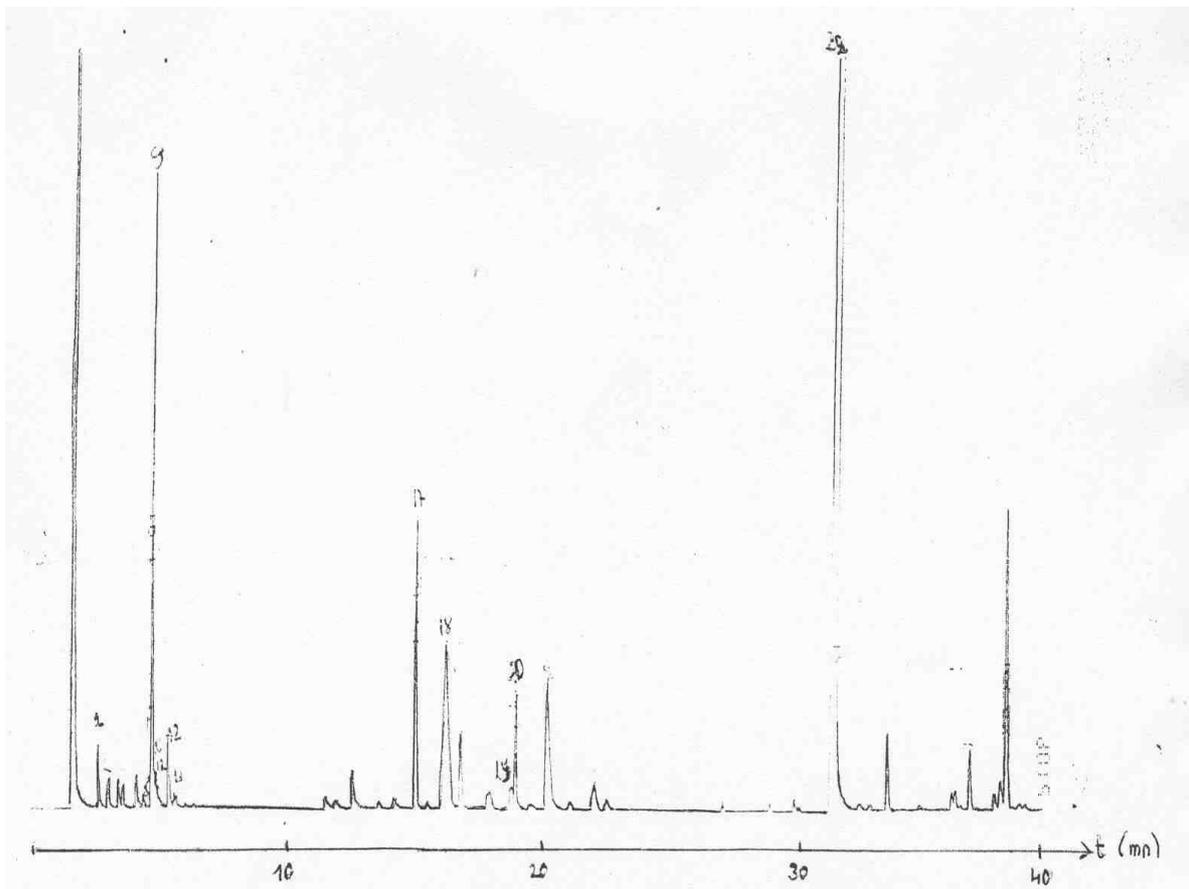


Figure 25: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* recueillie sur l'arbre 1.

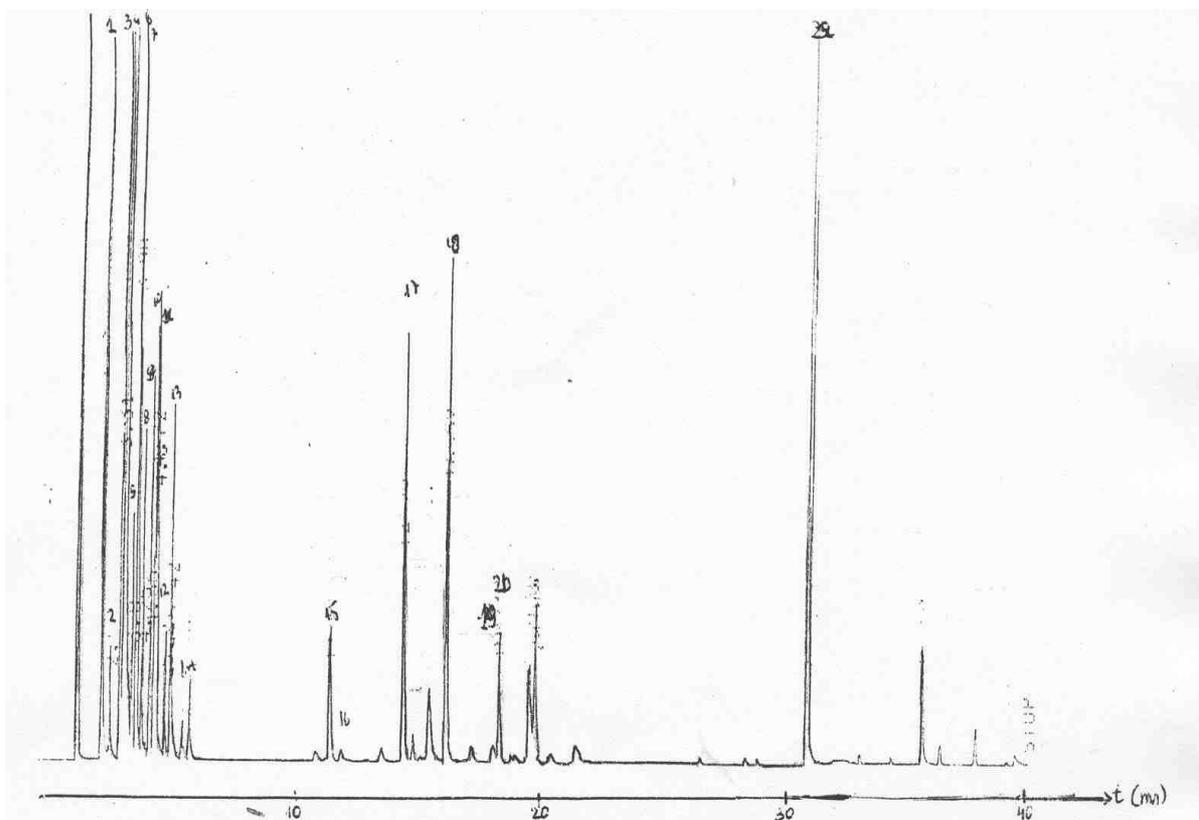


Figure 26 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* recueillie sur l'arbre 2.

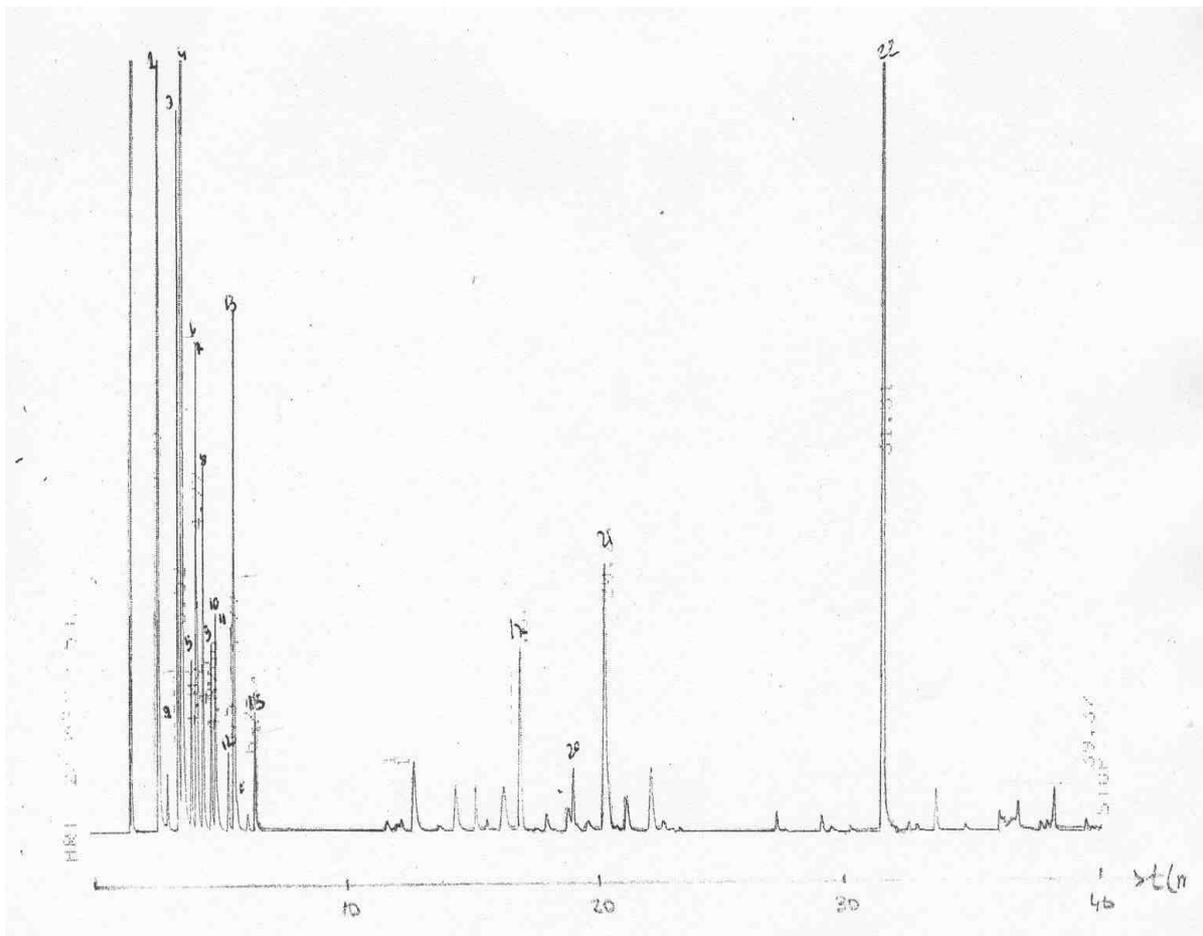


Figure 27: Chromatogramme de l'huile essentielle de Ravensara aromatica recueillie sur l'arbre 3.

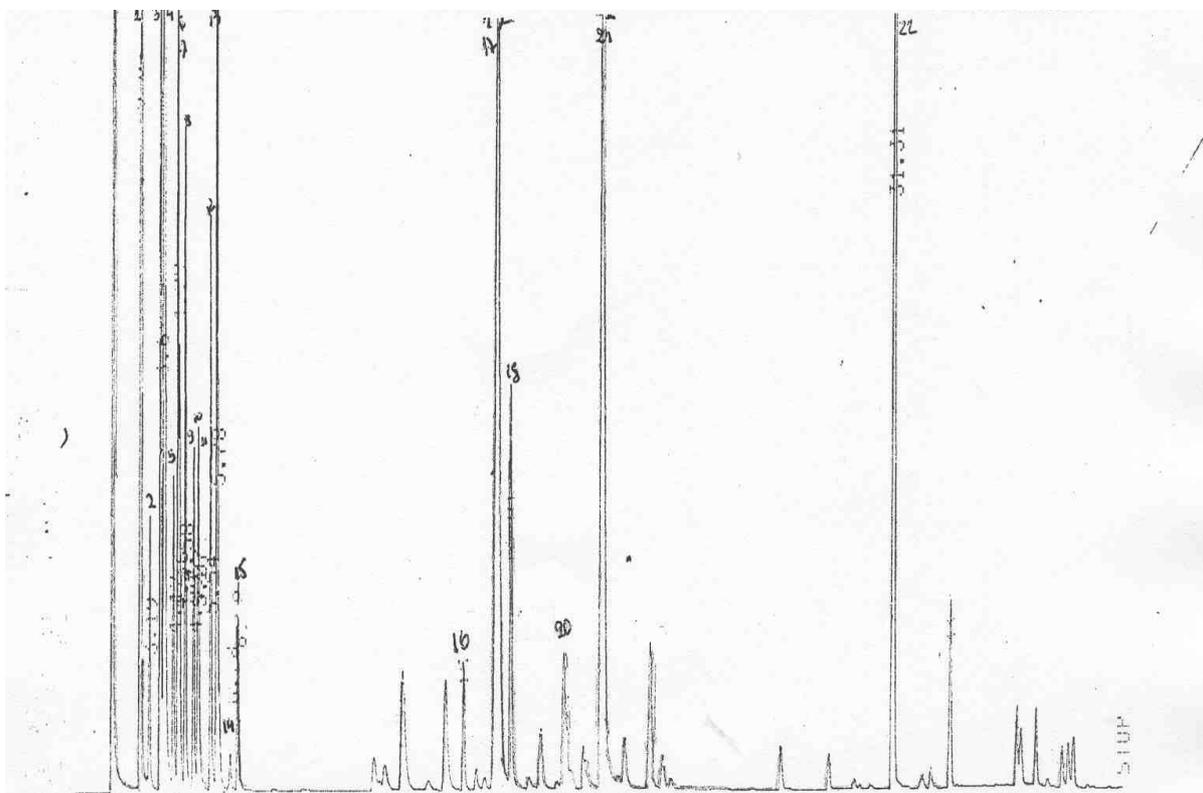


Figure 28: Chromatogramme de l'huile essentielle de Ravensara aromatica recueillie sur l'arbre 4.

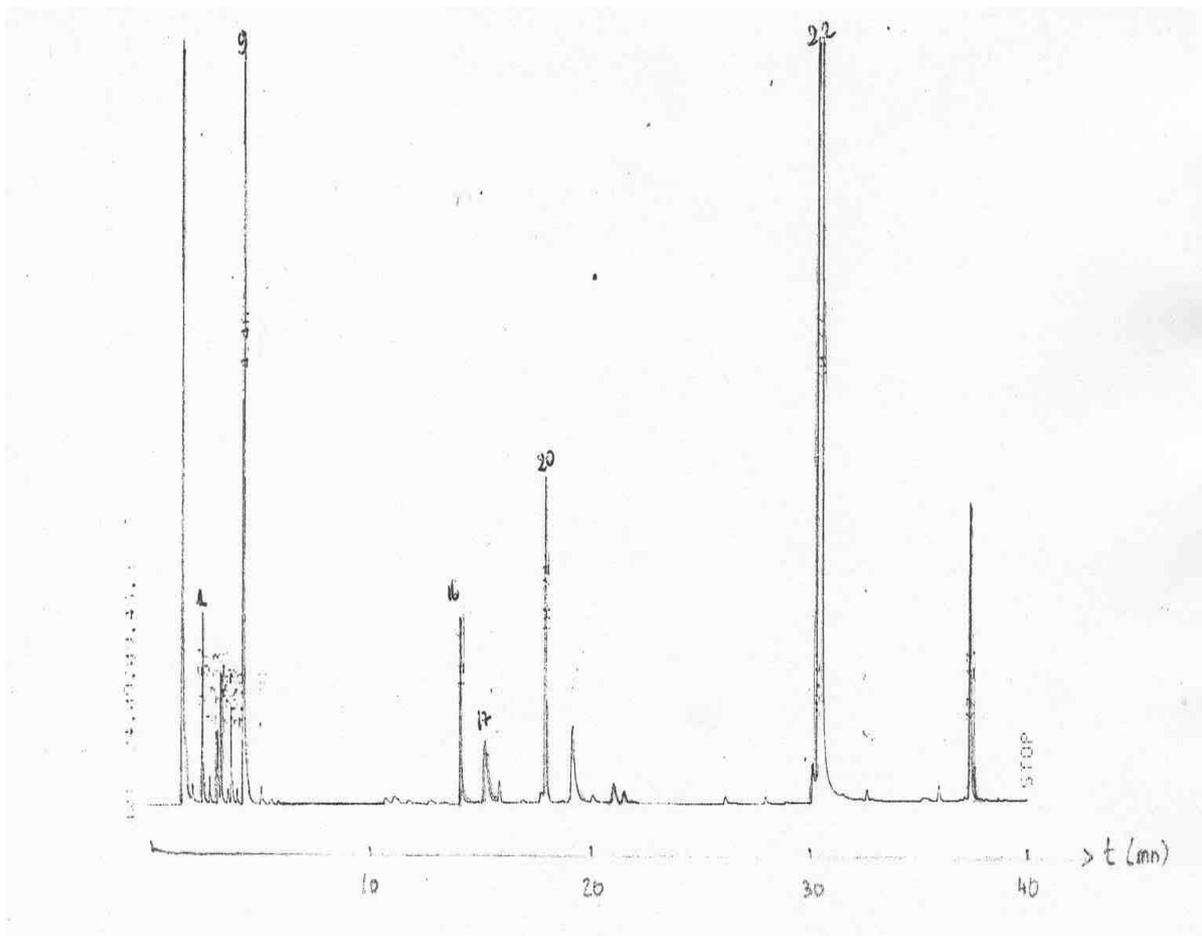


Figure 29 : Chromatogramme de l'huile essentielle de Ravensara aromatica recueillie sur l'arbre 5.

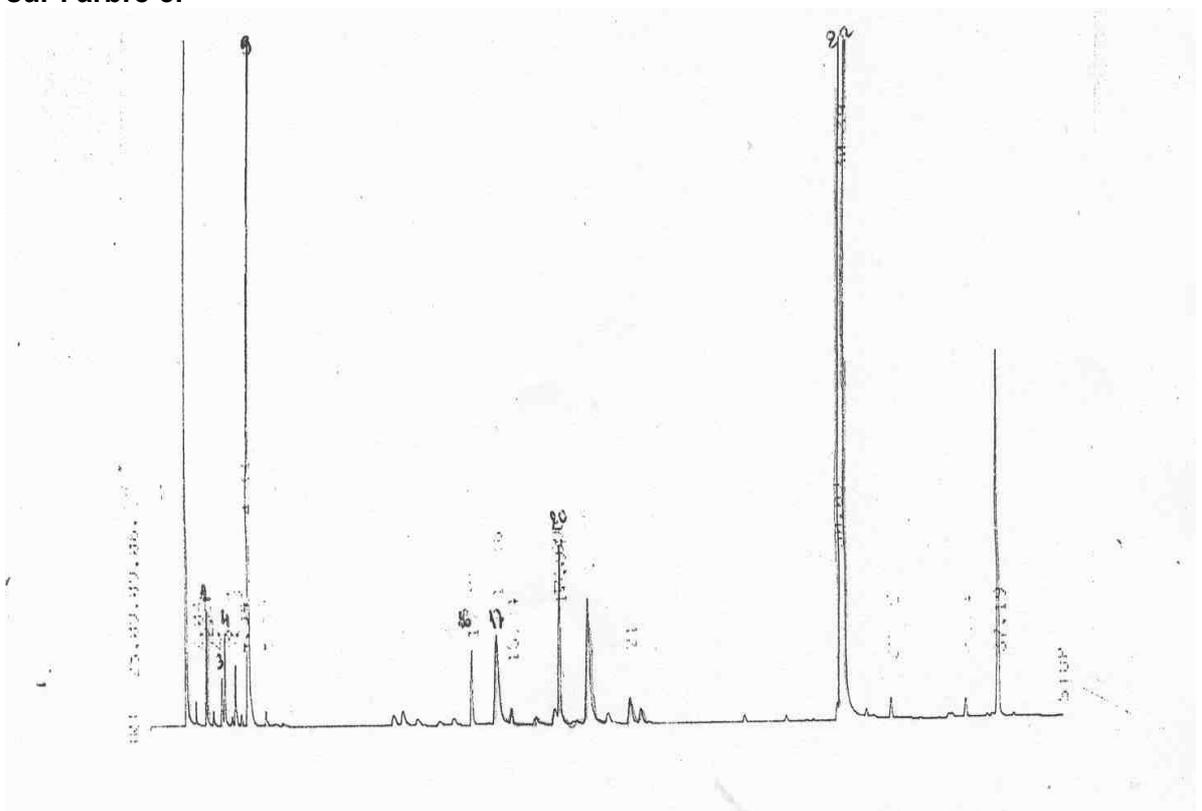


Figure 30 : Chromatogramme de l'huile essentielle de Ravensara aromatica recueillie sur l'arbre 6.

III.5. Recommandations

3.5.1. Matériel de collecte :

Devant l'accentuation du phénomène de dégradations forestière, l'utilisation de matériels de collecte adéquats s'avère nécessaire. La pratique de grimpettes et des échelles est efficace mais leur utilisation présente aussi des limites et des inconvénients.

3.5.1.1. Avantages :

- La grimpette est simple à manipuler. De plus, le risque exposé au grimpeur est réduit car il est attaché par un câble en acier qui est attaché autour de l'arbre.
- Après formation assurée par des spécialistes, on peut récolter presque la totalité de la biomasse foliaire en un temps très court.

3.5.1.2. Inconvénients et limite :

- La pénétration du crampon dans l'écorce de la plante entraîne des blessures qui seront sources de maladies.
- Le vent fort et la pluie ne permettent pas d'utiliser la grimpette et l'échelle car l'arbre devient très glissant.

3.5.2. Récupération des huiles essentielles :

Du point de vue composition chimique, l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* particulièrement celle du groupe II est riche en produits polaires qui sont très solubles dans l'eau. Il serait donc important de récupérer les huiles secondaires par différentes techniques.

3.5.2.1. Décantation prolongée :

La densité de l'huile est très voisine de celle de l'eau. Il est donc nécessaire de laisser reposer pendant plusieurs heures le mélange eau-huile pour prolonger la durée de décantation afin de favoriser la séparation du mélange. Dans ce cas, on place plusieurs essenciers en cascades à la sortie du serpentin afin de récupérer les parties insolubles.

En effet, les coefficients de solubilité des divers composants sont différents. De ce fait, la partie soluble pourrait se mélanger facilement si on prolonge trop longtemps la décantation.

3.5.2.2. Cohobation :

Les eaux florales sortant de l'essencier entraînent une certaine quantité d'huile essentielle. En effet, ce sont surtout les parties solubles qui sont concernées. Comme le mode d'extraction se fait par entraînement à la vapeur, il s'agit donc de renvoyer l'eau florale sortant de l'essencier vers la chaudière.

On récupère ainsi l'huile en solution. Ceci est d'autant plus important que le rendement en huile essentielle est assez faible et la solubilité est importante.

Cette technique de recyclage de l'eau florale présente des inconvénients car la température élevée dans la chaudière peut décomposer les composants essentiels de l'huile essentielle.

3.5.3. Conditionnement et stockage :

Les huiles essentielles sont des produits qui se décomposent facilement. Elles doivent être stockées et conservées à l'abri de la lumière et de la chaleur pour éviter l'oxydation des substances chimiques. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons en verres dits « ambrés » afin d'éviter l'action de la lumière qui peut nuire la qualité. Elles doivent être à l'abri de l'humidité qui facilite les réactions enzymatiques d'hydrolyse.

CONCLUSION PARTIELLE III

D'après l'étude de la cinétique de distillation, nous pouvons retenir que :

- La teneur en huile essentielle diminue en fonction de la durée de distillation.
- La densité des huiles du groupe I et II augmentent au cours de l'extraction. De même pour l'indice de réfraction, il s'accroît durant l'extraction.
- Du point de vue composition-chimique, le groupe I est constitué de sabinène (38,27 – 18,03%), d' α -pinène (9,13– 12,55%) et de méthyl-eugénol (8,12– 11,22%).
Les huiles essentielles du groupe II présentent 2 fractions différentes :
 - Une fraction légère riche en méthyl eugénol (74,85 à 82,81%), en limonène (7,48– 4,48%) et en sabinène (4,82 – 3,07%).
 - Une fraction lourde constituée principalement de méthyl-eugénol (79,52 – 84,68%), de limonène (6,32 – 4,18%) et de sabinène (4,25 – 1,53%).

La comparaison des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles fraîches, séchées pendant 24 heures et 48 heures nous a permis de confirmer que :

- Le rendement (v/p) en huile essentielle augmente après séchage de la matière végétale
- Après séchage de 24 heures, la teneur en huile lourde s'accroît de 0,43 à 0,70% tandis que celle des huiles légères diminue de 0,17 à 0,07%.
- Le séchage de la matière végétale permet de réduire la durée de distillation
- L'essence obtenue à partir des feuilles fraîches, des feuilles séchées pendant 24 heures et 48 heures présentent des concentrations très élevées en hydrocarbures terpéniques (surtout le méthyl eugénol) et celles des produits oxygénés restent assez faibles

Bien que les échantillons analysés constituent un ensemble d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* à faible diversité, ils ont montré des variations significatives au niveau de leur composition chimique.

L'étude de la variabilité individuelle confirme l'existence de 2 chémotypes d'huile essentielle de *Ravensara aromatica*. Par leur composition chimique, on distingue :

- Les huiles essentielles du groupe I riche en sabinène et autres hydrocarbures terpéniques.
- Les huiles essentielles du groupe II riche en méthyl eugénol (plus de 75%).

L'utilisation de matériel de collecte adéquat s'avère nécessaire pour atténuer la dégradation forestière.

CONCLUSION GENERALE

Le *Ravensara aromatica* est une des plantes à huiles essentielles endémiques à Madagascar. Il s'adapte parfaitement sur la côte est. Le groupement « ravintsaran'i Betanimainty » dont la principale activité est de produire de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* assure le contrôle de la forêt de Betanimainty où la présente étude est effectuée. Les résultats de la composition chimique de l'huile dans des travaux antérieurs sont très hétérogènes à cause de la confusion entre *Ravensara aromatica*, *Ravintsara* et *Ravensara anisata*. On peut extraire de l'huile essentielle à partir de l'écorce et des feuilles dont la composition chimique est très différente.

La distillation est menée avec des feuilles fraîchement cueillies ou séchées pendant 24 heures ou 48 heures. L'approvisionnement en matière première s'effectue à l'aide d'une grimpeuse et d'un échenilloir par des spécialistes. Le mode de distillation adoptée est l'entraînement à la vapeur à l'aide de deux alambics installés proches des paysans riverains.

La distillation fractionnée des huiles essentielles a permis d'étudier la cinétique de distillation. La teneur en huile essentielle diminue en fonction de la durée de distillation. Ainsi, le rendement (v/p) en huile du groupe I et du groupe II passe respectivement de 0,63 à 0,01% et de 0,42 à 0,02% pendant 4 heures de distillation.

Le rendement par heure en huile légère du groupe II est largement faible par rapport à celui en huile lourde.

- Concernant les caractéristiques physico-chimiques, la densité des huiles du groupe I et II augmentent au cours de l'extraction. Elle passe de 0,8768 à 0,8963 pour le groupe I et de 1,0041 à 1,0132 pour l'huile lourde du groupe II. De même pour l'indice de réfraction, il s'accroît durant l'extraction. Il augmente de 1,4775 à 1,4905 durant 4 heures pour le groupe I ; de 1,5181 à 1,5248 pour l'huile légère du groupe II et de 1,5196 à 1,5258 pour l'huile lourde du groupe II.
- Du point de vue composition-chimique, le groupe I est constitué de sabinène (38,27 – 18,03%), d' α -pinène (9,13– 12,55%) et de méthyl-eugénol (8,12– 11,22%).

Les huiles essentielles du groupe II présentent 2 fractions différentes :

- Une fraction légère riche en méthyl eugénol (74,85 à 82,81%), en limonène (7,48– 4,48%) et en sabinène (4,82 – 3,07%).
- Une fraction lourde constituée principalement de méthyl-eugénol (79,52 – 84,68%), de limonène (6,32 – 4,18%) et de sabinène (4,25 – 1,53%).

La comparaison des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles fraîches, séchées pendant 24 heures et 48 heures nous a permis de confirmer que :

- Le rendement (v/p) en huile essentielle augmente après séchage de la matière végétale. Il passe de 0,50 à 0,98% après 24 heures pour le type I et de 0,59 à 0,75% pour le type II.
- Après séchage de 24 heures, la teneur en huile lourde s'accroît de 0,43 à 0,70% tandis que celle des huiles légères diminue de 0,17 à 0,07%.
- Le séchage de la matière végétale permet de réduire la durée de distillation ; on obtient les trois quarts d'huile à la deuxième heure après séchage de 24 heures et dès la première heure après 48 heures. Ce qui est bénéfique pour les distillateurs du point de vue économie de temps et de l'énergie.
- L'essence obtenue à partir des feuilles fraîches, des feuilles séchées pendant 24 heures et 48 heures présentent des concentrations très élevées en hydrocarbures terpéniques (surtout le méthyl eugénol) et celles des produits oxygénés restent assez faibles

- Aucun nouveau pic n'est apparu après une durée déterminée de séchage de la matière première. On admet alors que des transformations chimiques n'ont pas pu avoir lieu au cours de la conservation.

L'étude de la variabilité individuelle confirme l'existence de 2 chémotypes d'huile essentielle de *Ravensara aromatica*. Par sa composition chimique, on distingue :

- Les huiles essentielles du groupe I riche en sabinène
- Les huiles essentielles du groupe II riche en méthyl eugénol.

Pour mieux gérer la production d'huile essentielle de *Ravensara aromatica*, promouvoir la collecte de matière première par l'utilisation de grimpettes et d'échenilloir. Pour éviter toutes pertes de produits finis, la récupération des huiles secondaires est nécessaire par décantation prolongée ou par cohobation. L'huile essentielle doit être stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité par l'utilisation de matériau bien hermétique et en verre ambré pour éviter toutes réactions chimiques qui peuvent nuire la qualité.

BIBLIOGRAPHIE

1. AFNOR, 1992, Huiles essentielles, Recueil des normes françaises des huiles essentielles, AFNOR, 4^{ème} Edition
2. ANTONOT E. ; MARCHAL R., 1998, Chromatographie, Stage de MAFPEN.
3. BRUNETON J., 1999.-Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. 3^{ème} édition revue et augmentée.
4. KOSTERMANS, A.G.H., 1950, Flore de Madagascar et des Comores, 81 ème famille.
5. MÖLLENBECK, S.; KÖNIG, T.; CHREIER, P.; CHWAB, W.; RAJAONARIVONY J.;RANARIVELO L., 1997, Chemical composition and analyses of enantiomers of essential oils from Madagascar, Flavour and fragrance journal, **12**, n°2, p.63-69.
6. NERLET N., 1993, Les huiles essentielles : production mondiale, échanges internationaux et politique de développement, Thèse de doctorat en Sciences économiques.
7. BEHRA O.; RAKOTOARISON C., A taxonomic clarification Ravintsara vs Ravensara.
8. RAHARIVELOMANANA P.J., 1988, Contribution à l'étude des huiles essentielles de *Laurus Nobilis*, DEA en Chimie des Produits Naturels, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.
9. RAJAOMILISON J. P., 1986, Contribution à l'étude technologique et analytique de giroflier (*Eugenia Caryophyllata*) hémisynthèse de quelques dérivés de l'eugénol, Mémoire de fin d'études, ESSA, Département IAA, Université d'Antananarivo.
10. RABEARIVONY R., 1985, Contribution à l'étude de l'huile essentielle de Palma rosa. Mémoire de fin d'étude, ESSA, Département IAA, Université d'Antananarivo.
11. RAMANOELINA P., 1997, Industrie des plantes aromatiques, huiles essentielles et extraits, Polycope ESSA, Département IAA.
12. RAMANOELINA P., 1997, Méthodes d'analyse et de contrôle II, Polycope, ESSA, Département IAA.
13. RAONIZAFINIMANANA B., Cours de Méthode d'analyse et de contrôle I, IAA, ESSA.
14. RAZAFINDRAJAONA J. M., Introduction à la recherche, Polycope, , ESSA, Département IAA.

15. RAZAFINDRAMIARANA H., 1985, Contribution à l'étude de l'huile essentielle de la cannelle, Mémoire de fin d'études, ESSA, Département IAA, Université d'Antananarivo.
16. RAZAFINIMANANA, E.J., 2001, Contribution à l'optimisation de la production de l'HE de *Ravensara aromatica* Sonnerat dans la région de Moramanga. Mémoire de fin d'études., ESSA, Département IAA, Université d'Antananarivo.
17. THERON, E. ; HOLEMAN, M. ; POTIN GAUTIER, M. ; PINEL, R., 1994, Authentication of *Ravensara aromatica* and *Ravensara anisata*, *Planta medica*, **60**, n°5, p.489-491.
18. TRANCHANT J., 1982, Manuel chromatographie en phase gazeuse, 3^{ème} Edition.
19. VIAUD H., 1993, Distillateur-thérapeutiques naturelles- GNOMA.
20. www.123bio.net/chromato/cours/chromato.html.
21. www.olivierbehra.com/fr/huile_essentielle.html

ANNEXE I: PROTOCOLE DE DISTILLATION

Vérification du dispositif

1. Conduite d'eau

- Assurer que l'eau arrive bien dans le tank à eau
- Assurer que l'eau arrive dans les condenseurs
- Fermer ou ouvrir les robinets selon nécessité

2. Chaudière

- Remplir d'eau la chaudière. Une fois qu'elle est pleine (vérifier niveau d'eau), fermer le robinet et remplir d'eau le réservoir d'eau de réserve.

N.B. On ne renouvelle pas l'eau de la chaudière à chaque distillation, car l'eau restante dans la chaudière est désoxygénée, ce qui empêche l'attaque de la rouille sur le matériau.

- On utilise l'eau et le tuyau du condenseur pour le remplissage de la chaudière.
- Une fois que la chaudière est fin prête, on peut déclencher son chauffage

3. Alambic

- Avant chaque distillation, il faut que le cucurbite et le chapiteau soient bien propres (exempts d'impuretés: feuilles, débris de végétaux, boue, eau...)

4. Condenseur

- Il faut que le condenseur soit bien propre avant chaque utilisation (exempt d'huile, sans odeur,...)
- Remplir d'eau le condenseur au début de distillation. Fermer le robinet d'entrée d'eau jusqu'à ce que le 1/3 de la partie supérieure du condenseur se chauffe.

5. Essencier

- Assurer qu'il soit bien propre (vide, exempt d'huile, sans odeur,...)
- Le placer sous le condenseur avant chaque chargement du matériel végétal dans l'alambic.

6. Dispositif de décantation et de mesure d'huile essentielle

- Assurer que les ampoules à décanter soient prêtes (propres, en place, fermées). De même pour les éprouvettes graduées.

DISTILLATION

Préparation du matériel à distiller

1. Pesage du matériel végétal

- Peser le matériel végétal à distiller avant le chargement de l'alambic.
- Prendre en même temps les échantillons pour la prise d'humidité (voir protocole sur l'humidité)

2. Chargement de l'alambic

- Assurer que le support et la grille soient bien en place
- Remplir l'alambic du matériel végétal pré-pesé sans trop tasser.
- Mettre le chapiteau en place.

- Remplir d'eau les joints de l'alambic/chapiteau et du Chapiteau/condenseur. Il faut constamment d'eau dans ces parties.

3. Distillation proprement dite

- Vérifier que tout soit en bonne marche (niveau d'eau dans la chaudière, chapiteau bien placé, foyer bien alimenté,...)
- Veiller à l'arrivée de la première goutte. Elle marque le début de distillation
- Veiller à suivre rigoureusement le prélèvement des huiles selon protocole

Le long de la distillation, vérifier:

- Le feu: il faut qu'il soit constant.
- Le niveau d'eau dans la chaudière: Quand le rajout d'eau est nécessaire, ouvrir le robinet d'entrée d'eau dans la chaudière. Laisser couler le contenu du récipient d'eau de réserve dans la chaudière. Une fois que le niveau d'eau nécessaire est atteint, fermer le robinet et remplir d'eau tout de suite ce récipient.
- L'eau des joints: il faut qu'il y ait de l'eau en permanence dans ces joints. Vérifier de temps en temps.

ANNEXE II : PROTOCOLE DE DETERMINATION DU POIDS SEC DES FEUILLES DISTILLEES

La détermination de la teneur en humidité de la matière végétale à distiller est indispensable pour rapporter les résultats obtenus au poids de la matière sèche.

Sur le terrain, des échantillons pour la prise d'humidité seront prélevés, pesés et séchés à l'air à l'abri des intempéries puis conservés dans des poches avec du silicagel jusqu'à Tana où ils seront traités au laboratoire.

Avant le chargement de la matière végétale dans l'alambic :

- Prendre 10 échantillons de 5g environ dans le lot à distiller (12 à 15 kg par alambic), les peser (**Pi**);
- Préparer les sachets en tulle "moustiquaire" prévus pour ranger les échantillons étiquetés, pré-pesés à sécher à l'air (sous abri) pendant 24h ;
- Mettre ensuite chaque échantillon avec étiquette dans une poche en plastique contenant environ 10 à 15 g de silicagel. On renouvelle le silicagel saturé si la matière végétale transpire encore (présence de vapeur d'eau sur les parois de poches) afin d'éviter la moisissure.
- Bien ranger les échantillons à l'abri des intempéries et des prédateurs avant de les ramener au laboratoire afin de compléter le séchage à l'étuve jusqu'à poids constant.

Au laboratoire :

- Repeser chaque échantillon avant de sécher à l'étuve à 103 C pendant 24h.
- Après la sortie des échantillons de l'étuve, mettre dans des dessiccateurs avec du silicagel, et laisser refroidir.
- Repeser chaque échantillon et remettre dans l'étuve pendant 1h. Laisser refroidir et peser. Procéder ainsi jusqu'à l'obtention de poids constant (**Ps**).

N.B. Le poids constant est obtenu lorsque la différence de poids entre 2 pesées consécutives est inférieure à 0,1% du poids initial de l'échantillon.

Pour déterminer le poids sec absolu des masses foliaires mises en distillation, on utilisera le coefficient de siccité de la matière, c'est à dire le rapport du poids de la matière sèche et de la matière avant séchage.

$$S = \frac{Ps}{Pi}$$

Ps : Poids de la matière sèche après séchage

Pi: Poids initial de la matière avant séchage.

Le poids sec absolu de la matière sera obtenu en multipliant la valeur de la masse de la matière prise avant séchage par le coefficient de siccité.

Pour comparer les différentes masses foliaires mises en distillation, on utilisera la teneur en humidité :

$$H = \frac{(Pi - Ps)}{Pi} \times 100\%$$

Noter que $S = (100 - H) / 100$

ANNEXE III: PROTOCOLE DE LAVAGE DE L'ALAMBIC

Lavage de la cuve :

- Après déchargement des feuilles dans l'alambic, on procède au vidage de la cuve en ouvrant le robinet puis à l'enlèvement à la main des débris végétaux qui y restent.
- On ferme le robinet.
- On nettoie la cucurbite avec de l'eau et à l'aide d'une éponge en enlevant toutes sortes d'impuretés.
- On vide la cucurbite.
- On referme le robinet et on ajoute dans la cuve du savon liquide avec de l'eau.
- On évacue le liquide en ouvrant le robinet.
- On rince la cuve avec de l'eau jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de savon.

Lavage du condenseur :

- On bouche la sortie des hydrolats du serpentin.
- On ajoute de l'eau savonneuse dans le condenseur.
- On ouvre la sortie pour évacuer l'eau savonneuse.
- On nettoie le serpentin avec de l'eau jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de savon.

Lavage de l'ensemble des alambics :

On procède au démarrage de l'alambic sans charger du matériel végétal de façon que la vapeur nettoie toutes les tuyauteries de l'alambic.

ANNEXE IV: FICHE DE COLLECTE

Nom scientifique:

Famille:

Nom vernaculaire :

Date:

Nom du collecteur :

Heure du début de collecte:

Heure de fin de collecte :

Température journalière :

Pluviométrie :

Altitude :

Position topographique :

- a. haut versant
- b. flanc
- c. bas versant

Caractéristique de l'arbre :

- a. hauteur :
- b. diamètre :

Partie de la plante récoltée :

Présence de régénération :

N° de l'arbre :

Code :

Rang de collecte :

Poids de feuille cueillie :

FICHE DE DETERMINATION DE L'HUMIDITE

Nom du manipulateur :

CODE	Poids initial	Poids final	Humidité
Date et heure de pesée			

ANNEXE VI : REGLES GENERALES D'ETIQUETAGE ET DE MARQUAGE DES RECIPIENTS

NF T 75-002

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION :

La présente norme fixe les règles générales pour l'étiquetage et le marquage des récipients destinés à l'emballage des huiles essentielles en vue de faciliter l'identification de leur contenu.

2. DEFINITIONS :

2.1. *Etiquetage* :

Procédé qui permet l'identification et la spécification du contenu d'un récipient au moyen d'une étiquette d'in document accolé, d'un écriteau, etc. et qui, cependant, ne fait pas partie intégrante du récipient.

2.2. *Marquage* :

Procédé qui permet l'identification et la spécification du contenu d'un récipient au moyen d'une marque, d'un signe, d'une image faisant partie intégrante du récipient.

3. SPECIFICATIONS :

L'étiquetage et le marquage doivent être facilement compréhensibles et inscrits de manière visible en un endroit apparent, clairement lisibles et indélébiles.

Ils ne doivent pas :

- Etre dissimulés par d'autres indications ou images,
- Etre de nature à induire l'acheteur en erreur sur les spécifications, la nature, l'identité, la qualité, la composition, la durée, l'origine, la provenance, le mode de production ou d'obtention,
- Attribuer à l'huile essentielle des effets ou des propriétés qu'elle ne possède pas.

4. ETIQUETAGE – MARQUAGE :

Etant donné que les étiquettes peuvent être détruites totalement ou partiellement, on doit leur préférer le marquage, surtout sur les récipients de volume important : fûts, bidons,...

Les étiquettes peuvent être apposées sur les petits récipients servant aux fins d'échantillons de référence, pour les analyses ou pour les essais.

En particulier, les matériaux des étiquettes doivent être suffisamment résistants pour supporter les conditions de transport et les étiquettes doivent être apposées au moyen d'un procédé qui rende impossible leur substitution ou leur utilisation à d'autres fins.

Le marquage doit être apposé sur les récipients par un procédé qui le rende durable et indélébile.

5. MENTIONS :

L'étiquetage et le marquage doivent porter les mentions suivantes :

- La désignation commerciale de l'huile essentielle, le nom botanique (latin) de la plante et la partie de la plante dont elle est extraite,
- Le nom ou la raison sociale et l'adresse du fabricant ou d'un vendeur établi dans la Communauté européenne,
- La technique de production ou le traitement spécifique qu'elle a subi : distillation ou pression,
- Le pourcentage du principal constituant lorsque la valeur commerciale de l'huile en dépend,
- La masse brute, la taxe, la masse nette,

- Les conditions particulières de conservation, de transvasement éventuel, du mode d'utilisation,
- Le numéro de lot ou la date de fabrication permettant de retrouver toute indication sur l'origine et le mode d'obtention de l'huile essentielle, en cas de réclamation ou de non-conformité aux spécifications,
- Le pays d'origine ou la source d'achat,
- Les symboles et indications des dangers que présente l'emploi de la substance et le rappel des risques particuliers,
- La mention du point d'éclair pour le stockage éventuel dans un local ou une aire réservé aux produits inflammables,
- La date limite jusqu'à laquelle le produit conserve ses propriétés, pour les huiles essentielles destinées à l'alimentation.

ANNEXE VII: REGLES DE DENOMINATION NF T 75-004

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION :

La présente norme prescrit les règles à adopter pour désigner les huiles essentielles.

2. REFERENCE :

NF T 75-005 – Nomenclature botanique des huiles essentielles.

3. REGLES :

3.1. TERME GENERIQUE :

Pour distinguer les huiles essentielles des huiles grasses, utiliser l'expression « huile essentielle de ... » « oil of... » pour désigner les premières.

3.2. DENOMINATION USUELLE :

Faire suivre les mots « Huile essentielle de... » « (Oil of...) » de la désignation usuelle acceptée de la plante.

3.3. DENOMINATION BOTANIQUE :

Lorsque la plante n'a pas de nom usuel communément accepté, utiliser le nom botanique complet (nom de genre, d'espèce et d'auteur)

3.4. INDICATION DU CONSTITUANT CHIMIQUE PRINCIPAL :

Lorsqu'une même espèce botanique peut donner les huiles essentielles chimiquement différentes, les distinguer en précisant le nom du principal constituant chimique caractéristique.

3.5. INDICATIONS DES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES :

Désigner les hybrides interspécifiques par le nom commun. Cependant, afin d'éviter toute ambiguïté, ajouter dans la définition de la norme de l'huile essentielle, les binômes latins des espèces génitrices (mâles et femelles), selon les règles usuelles de nomenclature botanique.

3.6. INDICATION DES VARIETES OU DES CLONES :

Lorsque l'huile essentielle provient exclusivement de certaines variétés ou de certains clones de la même espèce, spécifier le nom généralement adopté de la variété ou du clone.

3.7. INDICATION DE LA PARTIE DE LA PLANTE :

S'il est possible d'extraire de l'huile essentielle de plusieurs parties d'une plante, faire précéder la désignation usuelle du nom de la partie utilisée.

3.8. INDICATION DU LIEU D'ORIGINE :

La même désignation usuelle pouvant être donnée à des plantes s'espèces distinctes provenant de différentes parties du monde, il est souvent nécessaire de distinguer les espèces, par indication du lieu géographique dont la plante est originaire. Dans ce cas, faire suivre la désignation usuelle de la plante du nom du pays ou de la région.

3.9. INDICATION DU LIEU DE PRODUCTION :

Des plantes de même espèce botanique peuvent croître naturellement dans des régions géographiques différentes. Leurs huiles essentielles peuvent avoir des caractères physiques et chimiques différents. Les distinguer en faisant suivre le nom de l'huile essentielle du nom de la région, ces deux noms étant séparés par un virgule.

3.10. INDICATION DU LIEU D'ORIGINE :

Des plantes de même espèce peuvent avoir été introduites dans des régions autres que celles dont elles sont originaires. Ces plantes peuvent ne pas présenter de différences morphologiques, mais leurs huiles essentielles peuvent avoir des caractères physiques et chimiques différents. Dans ce cas aussi préciser le lieu de production tout en rappelant l'origine primitive. Pour cela, indiquer après le nom de l'huile essentielle, le type suivi de lieu de production.

3.11. INDICATION DU MODE D'EXTRACTION :

Lorsque l'huile essentielle d'une plante peut être obtenue par différents procédés, indiquer la méthode utilisée à la fin du titre, précédée d'une virgule.