

# SOMMAIRE

	Pages
<b>INTRODUCTION</b> .....	01
<b>1<sup>ère</sup> partie : CONNAISSANCES GENERALES SUR <i>Ravensara aromatica</i> Sonnerat ET PRESENTATION DES ZONES D'ETUDES</b> .....	02
<b>I- PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	02
I-1 Problématique .....	02
I-2 Objectif de l'étude.....	02
<b>II CONNAISSANCES GENERALES SUR <i>Ravensara aromatica</i> Sonnerat</b> .....	02
II-1 Historique et origine de <i>Ravensara aromatica</i> .....	02
II-2 Différence entre <i>Ravintsara</i> , <i>Ravensare</i> , <i>Havozo</i> , <i>Ravensara anisata</i> .....	03
II-3 Systématique de <i>Ravensara aromatica</i> .....	03
II-4 Répartition géographique .....	04
II-5 Morphologie.....	05
II-6 Ecologie.....	06
II-7 Régénération.....	06
II-8 Utilisation de l'espèce.....	07
II-9 Localisation de l'huile essentielle .....	08
II-10 Conservation.....	09
<b>III- PRESENTATION DES ZONES D'ETUDES</b> .....	09
III-1 Ecosystème.....	09
III-2 Les sites d'études.....	09
III-2-1 Ampasina et Betanimainty.....	10
III-2-2 Didy.....	14
III-2-3 Anosibe an'Ala.....	16
III-2-4 Raboana.....	18
III-2-5 Morarano.....	20
<b>IV-GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET LA DISTILLATION</b> .....	21
IV -1 Définition .....	21
IV -2 Notion de qualité sur les huiles essentielles.....	22
IV-2-1 Variété botanique.....	22
IV-2-2 Matériel Végétal.....	22
IV-2-3 Conditions de collecte.....	23
IV-2-4 Processus de distillation.....	23
IV-3 Propriétés des huiles essentielles.....	23
IV-3-1 Propriétés organoleptiques .....	23
IV-3-2 Propriétés physico-chimiques .....	24
IV-4 Indications principales des huiles essentielles.....	25
IV-5 Les Modes et Voies d'Utilisation.....	25
IV-5-1 En usage externe.....	25
IV-5-2 En usage interne.....	25
IV-6 Intérêts industriels des huiles essentielles.....	26
IV-6-1 Parfumerie.....	26
IV-6-2 Cosmétologie .....	26
IV-6-3 Arômes alimentaires .....	26
IV-6-4 Aromathérapie.....	26
IV-7 Conditionnement et stockage des huiles essentielles.....	27

IV-8 Procédés d'extraction d'huiles essentielles.....	28
IV-8-1 Extraction par solvant .....	28
IV-8-2 Extraction par entraînement à la vapeur.....	28
Conclusion partielle .....	29
<b>2<sup>ème</sup> partie : MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>30</b>
<b>I- MULTIPLICATION VEGETATIVE DU <i>Ravensara aromatica</i> PAR BOUTURAGE.....</b>	<b>30</b>
I-1 Choix de la technique de multiplication végétative.....	30
I-1-1 la méthode de culture utilisée.....	30
I-1-2 le bouturage .....	30
I-2 Objectifs du bouturage.....	30
I-3 Différents types de bouture.....	31
I-3-1 Boutures de fragment souterrain .....	31
I-3-2 Boutures des fragments aériens .....	31
a- La bouture herbacée .....	32
b- Les boutures de bois tendre .....	32
c- Les boutures semi ligneuses.....	32
d- Les boutures ligneuses.....	33
I-4 Type de bouturage effectué .....	33
I-5 Etapes de bouturage.....	33
I-6 Conditions de bouturage.....	33
I-6-1 Conditions de réussite.....	33
I-6-2 Choix de substrat.....	33
I-6-3 Bon candidat à la bouture.....	34
I-7 Conditions sous châssis.....	34
I-8 Matériels de bouturage.....	35
I-8-1 Les rameaux et matériaux utilisés .....	35
I-8-2 Les hormones.....	36
I-10 Lieu de collecte du matériel végétal.....	36
I-11 Technique expérimentale de bouturage.....	37
I-11-1 Récolte du matériel végétal.....	37
I-11-2 Préparation du matériel végétal.....	37
I-11-3 Condition de culture.....	38
I-11-4 Mise en culture des boutures- obtention de clones de <i>Ravensara aromatica</i> .....	38
I-11-5 Suivi du bouturage.....	38
I-11-6 Soins après reprise.....	39
<b>II- IDENTIFICATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>Ravensara aromatica</i>.....</b>	<b>40</b>
II-1 Analyse sur les rejets et les régénérations par graines .....	40
II-1-1 .....	40
Echantillonnage.....	
II-1-2 Détermination de l'humidité des feuilles.....	41
II-1-3 Distillation.....	41
II-3-1-1 Matériels d'extraction.....	41
II-3-1-2 Fiche technique de distillation de <i>Ravensara aromatica</i> .....	42
II-4-1 Détermination des caractéristiques de l'huile essentielle.....	42
II-4-1-1 Test olfactif.....	42
II-4-1-2 Caractéristiques physico-chimiques.....	43
a- Mesure de la densité .....	43

b- Mesure de l'indice de réfraction .....	44
II-4-1-3 Analyse en chromatographie en phase gazeuse .....	45
a- Généralité sur l'appareil CPG.....	45
b- Instrumentation.....	46
c- Principes de fonctionnement .....	46
d- Identification des pic.....	48
II-2 Analyse spectroscopie proche infra-rouge sur les clones de <i>Ravensara</i> <i>aromatica</i> .....	48
II-2-1 Historique de la méthode NIRS.....	48
II-2-2 Définition de la SPIR.....	49
II-2-3 Application NIRS.....	49
II-2-4 Avantages et inconvénients de l'analyse NIRS .....	50
II-2-5 Instrumentation de la SPIR.....	51
II-2-6 Principe général des appareils NIRS.....	51
a- Source lumineuse proche IR.....	53
b- Optique.....	53
c- Détection.....	53
II-2-7 La chimiométrie ou analyse des données IR.....	53
II-3 Méthodes d'analyses statistiques.....	54
II-3-1 Analyse en composantes principales (ACP).....	55
II-3-2 Classification hiérarchique ascendante (CHA).....	55
II-3-3 Analyse factorielle discriminante (AFD).....	56
Conclusion partielle .....	56
<b>3<sup>ème</sup> partie : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>58</b>
<b>I- RESULTATS DU BOUTURAGE .....</b>	<b>58</b>
<b>II- RESULTATS D'ANALYSE AU LABORATOIRE .....</b>	<b>60</b>
II-1 Extraction par entraînement à la vapeur.....	60
II-1-1 Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle.....	61
II-1-2 Caractéristiques d'analyse physicochimique de l'huile essentielle...	61
II-2 Résultats du test olfactif.....	65
II-3- Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> .....	70
<b>III- RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>75</b>
III-1 Résultats de l'ACP.....	75
III-1-1 Valeurs propres.....	75
III-1-2 Résultats et interprétations.....	76
III-2 Résultats de CHA .....	77
III-3 Résultats de AFD.....	78
<b>IV- CLASSES DES HUILES ESSENTIELLES OBENUS DES FEUILLES DE</b> <b>REJET, DE REGENERATION DE <i>Ravensara aromatica</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>V- RESULTATS DE L'ANALYSE NIRS.....</b>	<b>81</b>
Conclusion partielle .....	84
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>88</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACP: Analyse en Composantes Principales

AFD : Analyse Factorielle Discriminante

CHA : Classification Hiérarchique Ascendante

Chém : Chémotype

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

ESSA : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques

FOFIFA: Foibe Fikarohana momba ny FAmbolena

IAA : Industries Agricoles et Alimentaires

NIRS : Near InfraRed Spectroscopy

PLS : Partial Least Square

SPIR : Spectroscope Proche InfraRouge

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 01 : Zones de répartition de l'espèce <i>Ravensara aromatica</i> .....	05
Tableau n°02 : Moyenne de température et de précipitation mensuelles de la site de Betanimainty- Ampasina.....	10
Tableau n°03: Moyenne de température et de précipitation mensuelles de la site de Didy.....	14
Tableau n°04: Moyenne de précipitation mensuelles de la site d'Anosibeana'ala.....	17
Tableau n°05: Moyenne de température et de précipitation mensuelles de la site de Raboana.....	18
Tableau n°06: Moyenne de précipitation mensuelles de la site de Morarano.....	20
Tableau n°07: Exemple de composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de <i>Ravensara aromatica</i> (ANDRIANOELISOA <i>et al.</i> 2006) .....	24
Tableau n°08: Fiche de collecte sur terrain.....	40
Tableau n 09: Résultats d'observation boutures de <i>Ravensara aromatica</i> .....	59
Tableau n° 10: Caractéristiques physico-chimiques de quelques échantillons d'huiles....	61
Tableau n° 11: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques d'huile essentielle des feuilles du plante souche ( RAZAFINIMANANA ; 2001) avec du rejet de Betanimainty.....	62
Tableau n° 12: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques d'huile essentielle des feuilles du plante souche ( RAOBELISON ; 2001) avec du rejet dans la foret d'Amparihibe.....	63
Tableau n° 13: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques d'huile essentielle des feuilles du plante souche ( RAOBELISON ; 2001) avec ceux du rejet et de régénération dans la foret de Besakay.....	64
Tableau n° 14 : Comparaison des caractéristiques physico-chimiques d'huile essentielle des feuilles du plante souche ( RAOBELISON ; 2001) avec ceux des rejets et des régénérations dans la foret de Bemanja.....	64
Tableau n° 15: Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de <i>Ravensara aromatica</i> suivant les types chimiques.....	65
Tableau n° 16: Classement des feuilles par le test olfactif .....	65
Tableau n° 17: Classement des feuilles en deux groupes.....	66

Tableau n° 18: Classement des huiles essentielles par le test olfactif.....	66
Tableau n° 19: Classement des huiles essentielles en deux groupes.....	67
Tableau n° 20: Caractéristique des odeurs des huiles essentielles.....	67
Tableau n° 21: Classement des huiles essentielles par les six autres sujets.....	68
Tableau n° 22 : Récapitulation des classes des huiles.....	69
Tableau n° 23: Composition chimique des huiles essentielles de feuilles des pieds-mères,des rejets et des régénérations de <i>Ravensara aromatica</i> .....	71
Tableau n° 24: Valeurs propres des axes principaux (ACP) .....	75
Tableau n° 25: Résultats par classe.....	78
Tableau n° 26: Matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation.....	80
Tableau n° 27: Résultats récapitulatifs de l'analyse SPIR sur les feuilles de boutures, rejets et régénération .....	83

## LISTE DES PHOTOS

Photos n°01: Pied adulte de <i>Ravensara aromatica</i> .....	06
Photos n°02: Rejet de souche de <i>Ravensara aromatica</i> .....	07
Photos n°03: Fruits de <i>Ravensara aromatica</i> .....	08
Photos n°04: Graines de <i>Ravensara aromatica</i> .....	08
Photos n°05: Flacon de conditionnement d'huile essentielle.....	28
Photos n°06: Huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> .....	29
Photos n°07: Châssis.....	34
Photos n°08: Bouture de <i>Ravensara aromatica</i> sous châssis.....	35
Photo n°09: Rameau de bouture de <i>Ravensara aromatica</i> .....	35
Photos n°10: Bouture de <i>Ravensara aromatica</i> enraciné.....	39
Photos n°11: Bouture de <i>Ravensara</i> avec des nouvelles feuilles.....	39
Photos n°12: Appareil d'hydrodistillation.....	42
Photos n°13: Pycnomètre 2ml.....	43
Photos n°14: Réfractomètre d' ABBE.....	44
Photos n°15: Appareil de spectroscopie proche infra rouge.....	51

## LISTE DES FIGURES

Figure n° 01: Précipitation annuelle dans la région d' Ampasina – Betanimainty.....	13
Figure n°02 : Courbe de la température annuelle dans la région d' Ampasina – Betanimainty.....	13
Figure n°03 : Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région Ampasina-Betanimainty.....	13
Figure n°04 : Précipitation annuelle dans la région de Didy.....	15
Figure n°05 : Nombre de jours de pluie par an dans la région de Didy.....	15
Figure n°06: Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région de Didy.....	15
Figure n°07: Courbe de précipitation mensuelle dans la région d'Anosibe an'ala.....	17
Figure n°08: Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région d'Anosibe an'Ala	17
Figure n°09: Précipitations annuelles dans la région de Raboana.....	18
Figure n°10: Températures annuelles dans la région de Raboana.....	19
Figure n°11: Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région de Raboana.....	19
Figure n°12: Précipitations annuelles dans la région de Morarano.....	21
Figure n°13: Nombre de jours de pluie par an dans la région de Morarano.....	21
Figure n°14 : Les différents types de boutures.....	32
Figure n°15: Schéma d'un appareil de Chromatographie en phase gazeuse.....	46
Figure n°16: Schéma d'un injecteur.....	47
Figure n°17 : Schéma d'une colonne capillaire.....	47
Figure n°18 : Principe de la spectroscopie à transmission.....	52
Figure n°19 : Représentation spectrale des résultats de l'analyse NIRS.....	54
Figure n°20 : Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 1 à Besakay (Bs rj1).....	72
Figure n°21 : Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 2 à Besakay (Bs rj2).....	72
Figure n° 22: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 05 dans la forêt Bemanja (Bm rj5).....	73



Figure n° 23: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 06 dans la forêt Bemanja (Bm rj6).....	73
Figure n° 24: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 38 dans la forêt de Morarano (Mo rj38).....	74
Figure n° 25: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 39 dans la forêt de Morarano (Mo rj39).....	74
Figure n° 26: Représentations graphiques des variables et échantillons dans le plan formé par l'axe 1 et l'axe 2 montrant trois regroupements des individus des huiles essentielles des feuilles des rejets et des régénérations de <i>Ravensara aromatica</i> par l'ACP.....	76
Figure n° 27: Représentation des trois classes de répartition des huiles essentielles de feuilles de <i>Ravensara aromatica</i> .....	77
Figure n° 28: Représentation graphiques des variables et échantillons dans le plan formé par l'axe 1 et l'axe 2 montrant les trois regroupements par AFD.....	78
Figure n° 29: Spectres moyennés des classes des constituants aromatiques et terpéniques	81
Figure n° 30 : Représentation graphiques des individus (représenté par leur classe préétablie) par PLS.....	82
Figure n° 31 : Représentation graphiques des individus issus du groupe des composés aromatiques.....	82

## LISTE DES ANNEXES

Annexe n°01: Extraction par pression, par enfleurage, par CO <sub>2</sub> liquide.....	VI
Annexe n°02: Fiche de collecte.....	VII
Annexe n°03: Coordonnées géographiques de la zone de collecte de <i>Ravensara aromatica</i> .....	VIII
Annexe n°04: Fiche de distillation de <i>Ravensara aromatica</i> .....	IX
Annexe n°05: Fiche technique de distillation de <i>Ravensara aromatica</i> .....	IX
Annexe n°06: Test olfactif sur les huiles essentielles collectées dans les forêts de Betanimainty et Morarano.....	X
Annexe n°07: Mesure de pouvoir rotatoire, indice d'ester, indice d'acide.....	XI
Annexe n°08: Zone d'absorption dans le proche infrarouge.....	XIII
Annexe n°09: Exemple de fiche d'observation des boutures.....	XIV
Annexe n°10: Liste des échantillons « feuilles ».....	XV
Annexe n°11: Liste des échantillons « huiles » .....	XVI
Annexe n°12: Résultats généraux du test olfactif.....	XVII
Annexe n°13 : Statistique simple de l'ACP.....	XVIII

## **LISTE DES CARTES**

Carte n° 1: Localisation générale des zones d'études.....	11
Carte n° 2 : Localisation des cinq sites de travail.....	12

## PARTIE EXPERIMENTALE

Protocole de bouturage.....	I
Protocole de détermination de l'humidité par séchage.....	I
Protocole de l'hydrodistillation.....	II
Protocole d'analyses physico – chimiques d'huile essentielle.....	III
Mesure de la densité relative.....	III
Mesure de l'indice de réfraction.....	III
Analyse chromatographique.....	IV
Protocole du test olfactif sur les échantillons d'huiles essentielles de <i>Ravensara aromatica</i> .....	V

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

La valeur marchande des huiles essentielles dépend de leur composition chimique ainsi que de la teneur en certains de leurs éléments, selon l'exigence du marché en produits aromatiques. Pour ne pas déprécier leur valeur économique, cette teneur doit être homogène pour une espèce donnée.

L'huile essentielle de *Ravensara aromatica* présente une grande variabilité intra spécifique dans sa composition chimique et les analyses ont montré qu'il existe différents types chimiques de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica*. Il faut donc maintenir la stabilité de ces types chimiques pour les besoins commerciaux. D'où l'idée de reproduire végétativement les types chimiques intéressants. Une des méthodes de multiplication végétative des plantes est le bouturage qui reproduit fidèlement le matériel génétique d'un individu. Cette méthode est ainsi proposée afin de vérifier si le caractère « composition chimique » de l'huile essentielle d'un type chimique est d'origine génétique ou phénotypique.

La vérification des chémotypes d'huile essentielle selon le traitement sylvicole s'avère un travail intéressant avant de maintenir les types chimiques intéressants.

C'est ainsi que ce mémoire intitulé « Etude des effets de traitement sylvicole sur l'évolution des chémotypes d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* des forêts dans le corridor de Zahamena-Mantadia » a été réalisé.

Ce mémoire comporte trois grandes parties. Dans la première partie, seront présentées les connaissances générales sur l'espèce ainsi que les zones d'études ; la deuxième décrit les matériels et méthodes utilisés tandis que la troisième partie sera consacrée aux résultats trouvés et aux interprétations comprenant notamment les résultats de bouturage, les caractéristiques organoleptiques, physicochimiques et la composition chimique de l'huile essentielle extraite des feuilles de bouturage, rejet, régénération ainsi que l'évolution des chémotypes de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* selon les traitements sylvicoles.

**1<sup>ère</sup> partie : CONNAISSANCES  
GENERALES DE *RAVENSARA*  
*AROMATICA* SONNERAT ET  
PRESENTATION DES ZONES  
D'ETUDES**

# **1<sup>ère</sup> partie : CONNAISSANCES GENERALES SUR *Ravensara aromatica* Sonnerat ET PRESENTATION DES ZONES D'ETUDES**

## **I- PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF DE L'ETUDE :**

### **I-1 Problématique :**

*Ravensara aromatica*, un arbre endémique de Madagascar, fournissent une huile essentielle très recherchée tant au niveau mondial qu'international. De ce fait, l'espèce subit une dépression à cause de son abattage pour récolter le matériel végétal qui fournit l'huile essentielle de l'espèce, en l'occurrence sa multiplication végétative est donc intéressante. Or, les principaux débouchés par rapport à leur besoin n'acceptent qu'un certain type chimique. D'où l'étude de l'évolution des chémotypes dans l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* apparaît très intéressante.

C'est ainsi que ce mémoire a été réalisé pour étudier l'évolution des chémotypes d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* par traitement sylvicole.

### **I-2 Objectif de l'étude :**

Pour résoudre le problème norme de production de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* à Madagascar, la recherche est dirigée de façon à vérifier si le chémotype est maintenu chez les clones issus de bouturage et chez les rejets et les régénérations par graines. D'autre part, cette étude réalisée dans le cadre du projet FOREAIM, volet « restauration de la forêt dégradée à partir de plantation » d'espèces autochtones ou autres servira à développer la technique de bouturage, permettant d'obtenir, en grand nombre d'exemplaires la copie exacte de chaque chémotype, afin de parvenir à la restauration rapide de la fonction économique et environnementale de la forêt dégradée.

Troisièmement, *Ravensara aromatica* est une espèce menacée d'extinction, du fait de son exploitation à outrance pour son huile essentielle. Le bouturage se présente donc comme un outil de conservation et de propagation de cette espèce menacée.

## **II- CONNAISSANCES GENERALES SUR *Ravensara aromatica* Sonnerat**

### **II-1 Historique et origine de *Ravensara aromatica***

A Madagascar, les populations locales utilisent depuis très longtemps les végétaux pour se soigner. Ils appelèrent *Ravintsara* (de "ravina", feuille ou arbre, et "tsara", bonne) un camphrier de la famille des Lauracées aux vertus toniques et antivirales puissantes, découvert



au XVI<sup>ème</sup> siècle par les Français. Le terme *ravintsara* devint alors *ravensara* en latin, d'où le début des confusions. Un autre arbre aromatique, contenant de l'huile essentielle et poussant en forêt, est appelé par les Malgaches "hazomanitra", l'arbre qui sent bon. Celui-ci est en fait ce qu'on appelle aujourd'hui le *ravensare*. La distinction entre anisé et aromatique tient seulement à la partie distillée pour obtenir de l'huile essentielle. Si c'est l'écorce, il s'agit de l'huile de *ravensare* anisé ; s'il s'agit des feuilles, c'est du *ravensare* aromatique, encore peu connu malgré son odeur très fraîche et ses très nombreuses vertus thérapeutiques.

## **II-2 Différence entre Ravintsara, Ravensare, Havoza, Ravensara anisata :**

*Ravintsara* et *Ravensara* sont deux espèces différentes. L'origine, l'utilité, l'appellation des deux espèces sont tout à fait différentes.

- Les feuilles de *Ravintsara* dont le nom scientifique est *Cinnamosma camphora*, donne une huile essentielle caractérisée par sa forte teneur en 1,8 cinéole à une odeur fraîche et camphrée.

- *Ravensare* a une odeur légèrement anisée et poivrée. *Ravensare* (nom scientifique : *Ravensara aromatica*) est une plante endémique de Madagascar exploitée pour ses huile essentielle de feuilles et d'écorce. Le Havoza provient du *Ravensara aromatica* (écorce). La fabrication de cette huile essentielle étant destructrice de l'arbre, il est déconseillé de l'utiliser.

- *Ravensara anisata* = *Ravensara aromatica*

## **II-3 Systématique de Ravensara aromatica**

Découverte et nommée par Sonnerat en 1782, c'est une des plantes endémiques les plus connues à Madagascar communément appelée *Havoza* ou *Hazomanitra*, traduction de « arbre qui sent bon ».

*Ravensara aromatica* a été décrite par Flacourt en 1574 et Baumé avait distillé l'écorce depuis janvier 1775. (MALHEBIAU, 1994).

*Ravensara aromatica* appartient hiérarchiquement au :

Règne : VEGETAL

Sous-règne : METAPHYTES

Embranchement : SPERMAPHYTES

Sous-embranchement : ANGIOSPERMES

Classe : DICOTYLEDONES

Ordre : LAURALES

Famille : LAURACEAE

Genre : *Ravensara*

Espèce : *aromatica*

Cette espèce a plusieurs synonymes . (RAZAFIMAMONJISON , 2005)

- *Ravensara aromatica* Sonnerat (1782)
- *Evodia aromatica* Gaertn (1791)
- *Agathophyllum aromaticum* Willd (1799)
- *Evodia aromatica* Poir (1804)
- *Agathophyllum ravensara* Mirbel (1806)
- *Laurus aromatica* Ballon (1870)
- *Ravensara anisata* Danguy (1920)

Le *Ravensara* a une odeur légèrement anisée et poivrée

#### **II-4 Répartition géographique**

*Ravensara aromatica* pousse à une altitude comprise entre 700 à 1000 mètres, abondant dans la forêt primaire de l'Est ainsi qu'occasionnellement dans les forêts de la côte Est malgré la surexploitation dont il est jusqu'à présent victime.

*Ravensara aromatica* appelée communément havoza ou hazo manitra signifiant arbre aromatique en malgache, a été introduite à l'Ile Maurice et à la Réunion. Avec une hauteur de 30 m et poussant à une altitude d'environ 1000 m cet arbre florit dans la forêt humide du centre est de Madagascar. (HELVEL, 2006).

Les zones de répartition de l'espèce à Madagascar sont présentées dans le tableau n°01.

**Tableau n° 01 : Zones de répartition de l'espèce *Ravensara aromatica* (HUMBER, 1952)**

Régions bioclimatiques	Localisations de l'espèce
Région Orientale et Sambirano	Analamazaotra Moramanga
Région centrale	Ambositra Mandraka
Région Occidentale	Isalo Ouest de Tsironomandidy Oeust de Ranohira

### **II-5 Morphologie**

C'est un arbre de 20 à 30 mètres de haut à écorce brun rouge, aux feuilles oblongues vert foncé sur le dessus, clair en dessous, reconnaissable par ses fleurs vertes et à ses fruits divisés en six septums qui contiennent aussi de l'huile essentielle.

✚ Les *rameaux* sont cylindriques. L'écorce est rougeâtre et épaisse de 6 à 8 mm. Les *feuilles* sont simples, alternes, lisses, glabres, coriaces, à face supérieure terne, de couleur vert sombre. La face inférieure est terne à nervure médiane un peu saillante, tandis que la face supérieure est verte, brillante et un peu saillante. Ce sont des feuilles caduques. La période de défoliation se situe entre juillet, août et septembre.

- ✚ Le *tige* : c'est un arbre à rameaux glabres, cylindriques, lisses, à grandes lenticelles elliptiques, aux bourgeons garnis de très petits poils serrés, jaunâtres.
- ✚ Les *fleurs* sont hermaphrodites, vertes campanulées, à peine poilue de 2 à 3,5 mm de longueur. Etamines en cluse, ovaire glabre ou ellipsoïdal - ovoïde. La floraison de l'espèce se situe entre Octobre et Janvier (floraison souvent avant feuillaison).
- ✚ Les *fruits* sont subglobuleux, de 2,5cm de diamètre, assez lisse, à 6 côtes obscures contenant chacun une graine, apiculés, à base un peu aplatie. (RAOBELISON, 2003)



Photos n°01 : Pied adulte de *Ravensara aromatica*

Cliche : RAZAFIMAMOMJISON, 2005

### **II-6 Ecologie :**

#### **- Climat :**

\*Pluviométrie moyenne annuelle, aux environ de 1600 mm

\*Température moyenne annuelle : 18 – 24°C

#### **- Sol :**

\*Texture et structure : argileux et latéritique des plateaux, hydro morphes (bas-fonds forestiers), argilo sableux plus près de la côte, à moindre altitude, perméabilité moyenne.

\*Drainage : moyen à bon

#### **- Biologie :**

\*Feuillaison : feuilles persistantes

\*Floraison : Octobre – janvier. La floraison se passe souvent avant la feuillaison

\*Fructification : mai – juillet.

- **Groupelements végétaux** : Forêts denses humides de moyenne altitude de 1000 à 1400m d'altitude. (CABANIS et al. 1970)

- **Localisation et station** : C'est une espèce qui pousse bien sur le versant jusqu'au sommet quelle que soit l'orientation.

### **II-7 Régénération :**

*Ravensara aromatica* se produit naturellement par graines sans intervention sylvicole. Ainsi, il s'agit d'une régénération naturelle.

L'espèce se trouve sur une pente moyenne ou abrupte, par conséquent ses fruits sont dispersés sous l'action de la pesanteur si bien que les plantules issues de la germination se

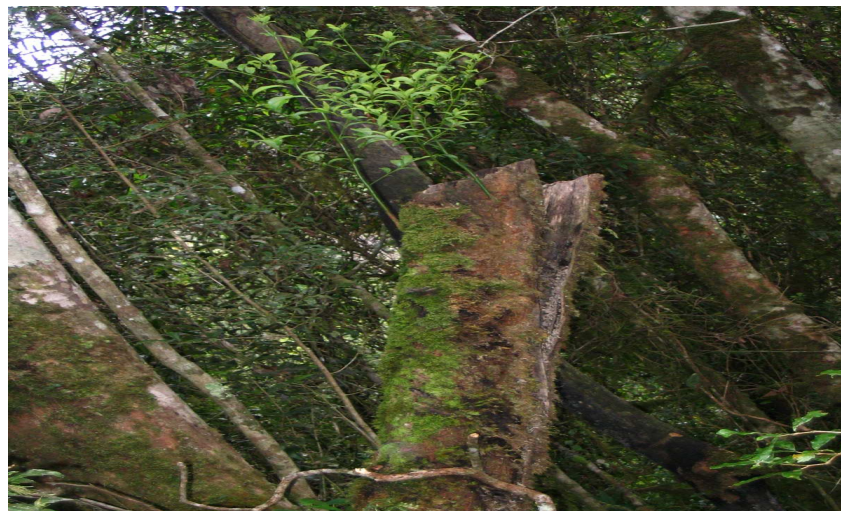
rencontrent autour d'un rayon de 3 m jusqu'à 8 m des pieds-mères. Ce sont des graines barochores. Il y a des plantules qui sont arrivées aux stades jeunes plantes et adultes (RAKOTOMARO *et al.*2000). La coupe des tiges de *Ravensara aromatica* Sonnerat est observée dans le type de forêt peu dégradée.

L'éclairement est indispensable au Havoza pour sa croissance et le développement de la biomasse foliaire.

### **II-8 Utilisation de l'espèce**

Les feuilles et l'écorce de *Ravensara aromatica* sont destinées à l'extraction d'huiles essentielles. L'huile obtenue est utilisée dans le domaine de la cosmétique et de la pharmacopée. Elle est reconnue pour avoir d'excellentes propriétés immunostimulantes, anti-infectieuses, anti-inflammatoires, calmantes et anti-fongiques. Elle est recommandée contre les allergies et les inflammations. Les feuilles sont aussi des remèdes pour les désordres mentaux et physiques, pour le traitement de l'asthme, gripes, sinusites, rhinopharyngites, bronchites, coqueluches, hépatites virales. L'écorce est utilisée pour faire expulser les gaz intestinaux et contre diverses affections. (LABEL CBD)

Puissant antiviral, c'est aussi un remède anti-stress et un tonique général, qui n'a pas été produit de manière continue et qui est inconnu bien que son nom soit à tort très répandu.



Photos n°02: Rejet de souche de *Ravensara aromatica*

Source : Cliché de l'auteur





Photos n° 03: Fruits de *Ravensara aromatica*

Source : Cliché de l'auteur



Photos n°04 : Graines de *Ravensara aromatica*

Source : Cliché de l'auteur

### **II-9 Localisation de l'huile essentielle**

La synthèse et l'accumulation d'huile essentielle 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*, les cellules placées dans le parenchyme palissadique contiennent l'essence.

L'extraction peut aussi se faire à partir de l'écorce de *Ravensara aromatica*. Selon la partie distillée, les résultats sont très différents du point de vue composition chimique. (KOSTERMANS, 1950)

### **II-10 Conservation :**

*Ravensara aromatica* est une espèce méritant un programme de gestion de ressources génétiques. C'est une espèce exploitée, mais devant être régénérée. Elle a une valeur socio-économique importante. (SNGF, 1999) : c'est une espèce productrice d'huile essentielle.

Comme il y a plusieurs types chimiques de *Ravensara aromatica* à Madagascar, les producteurs confondent les huiles essentielles issues de ces différents types chimiques. Ainsi, la production des plants de même chémotype est actuellement indispensable pour y faire face .et la multiplication végétative constitue une solution pour y parvenir et aussi pour garder les caractéristiques du pied-mère.

## **III- PRESENTATION DES ZONES D'ETUDES**

### **III-1 Ecosystème**

*Ravensara aromatica* est localisé dans les forêts denses humides sempervirentes de basse et de moyenne altitude du Centre Est de Madagascar. Les zones sont caractérisées par un climat chaud et humide.

### **III-2 Les sites d'études**

Comme l'objectif de ce travail consiste à vérifier l'évolution des chémotypes selon le traitement sylvicole, le choix des zones de récolte a été basé sur la présence de l'espèce où on a déjà effectué l'analyse, la présence de rejets de souche et de régénération.

D'après ces critères, quatre sites situés dans la zone de répartition de *Ravensara aromatica* ont été choisis, notamment Ampasina – Betanimainty, Didy, Anosibeana'ala et Raboana qui se trouvent dans la région Alaotra Mangoro.

Dans l'ensemble, la région Alaotra Mangoro est implantée entre « la falaise de l'Angavo » à l'Ouest et « la falaise Betsimisaraka » à l'Est. Elle se présente ainsi comme une cuvette surmontée par des escarpements de montagnes. Caractérisée par un climat tropical chaud et humide, avec l'influence de l'alizé toute l'année et des températures moyennes comprises entre 18 et 20 °C, la partie Sud (Moramanga et Anosibe An'Ala) est marquée par l'abondance pluviométrique tandis que celle du Nord subit parfois des sécheresses temporaires et attend le passage des dépressions tropicales pour satisfaire les besoins en eau des cultures.

### III-2-1 Ampasina-Betanimainty

Le site de Betanimainty présente trois forêts distinctes : Bemanja, Besakay, et celle d'Amparihibe.

Dans le site de Betanimainty, nous avons trouvé beaucoup de jeunes plantules aptes à se développer durant la collecte, d'où l'intérêt de vérifier les caractéristiques des chémotypes des régénérations. La présence de nombreuses plantules de Havoza sous le pied adulte portes-graines constitue une bonne indication de la germination des graines.

#### ○ Localisation et description :

Ampasina et Betanimainty appartiennent à la commune d'Ampasimpotsy, sous-préfecture de Moramanga. Cette zone d'étude est située entre 08°58'02'' et 19°03'54'' de latitude Sud et 048°22'41'' et 048°26'10'' de longitude Est.

Le type de forêt y est dense de moyenne altitude sous un climat chaud et humide. *Ravensara aromatica* Sonnerat pousse bien dans cette région.

Ampasina est une des régions de collecte des rameaux pour les boutures tandis que Betanimainty est une des régions de collecte des feuilles de rejet et de régénération pour la distillation.

#### ○ Relief

La région Ampasina – Betanimainty est caractérisée par des reliefs très accidentés à pentes raides de 40% à 60% avec une altitude de 850 à 1250m. Les formes du relief paraissent arrondies 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 tableau n°02 montre les caractéristiques climatiques de cette région.

**Tableau n°02 : Moyenne de température et de précipitation mensuelles de la site de Betanimainty-Ampasina. Période 1961 – 1990**

Mois	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc
Precipitations (mm)	342,6	296,8	261,7	95,9	51,3	66,5	99,7	99,0	44,5	62,5	118,3	250,8
Nombre de jours de pluie	20,5	19,2	21,5	16,6	15,3	15,6	19,6	19,3	12,6	12,9	14,8	19,6
Precipitation max de 24h	247,5	285,7	292,7	227,0	38,6	50,7	40,3	63,0	47,8	46,6	66,9	117,6
Temperature min	16,0	16,2	15,9	14,7	12,8	10,6	10,2	10,1	10,6	12,4	14,2	15,7
Temperature max	26,1	26,2	25,3	24,6	22,6	20,7	19,5	19,9	21,5	23,6	25,0	25,9
Temperature moy	21,1	21,2	20,6	19,7	17,7	15,7	14,9	15,0	16,1	18,0	19,6	20,8

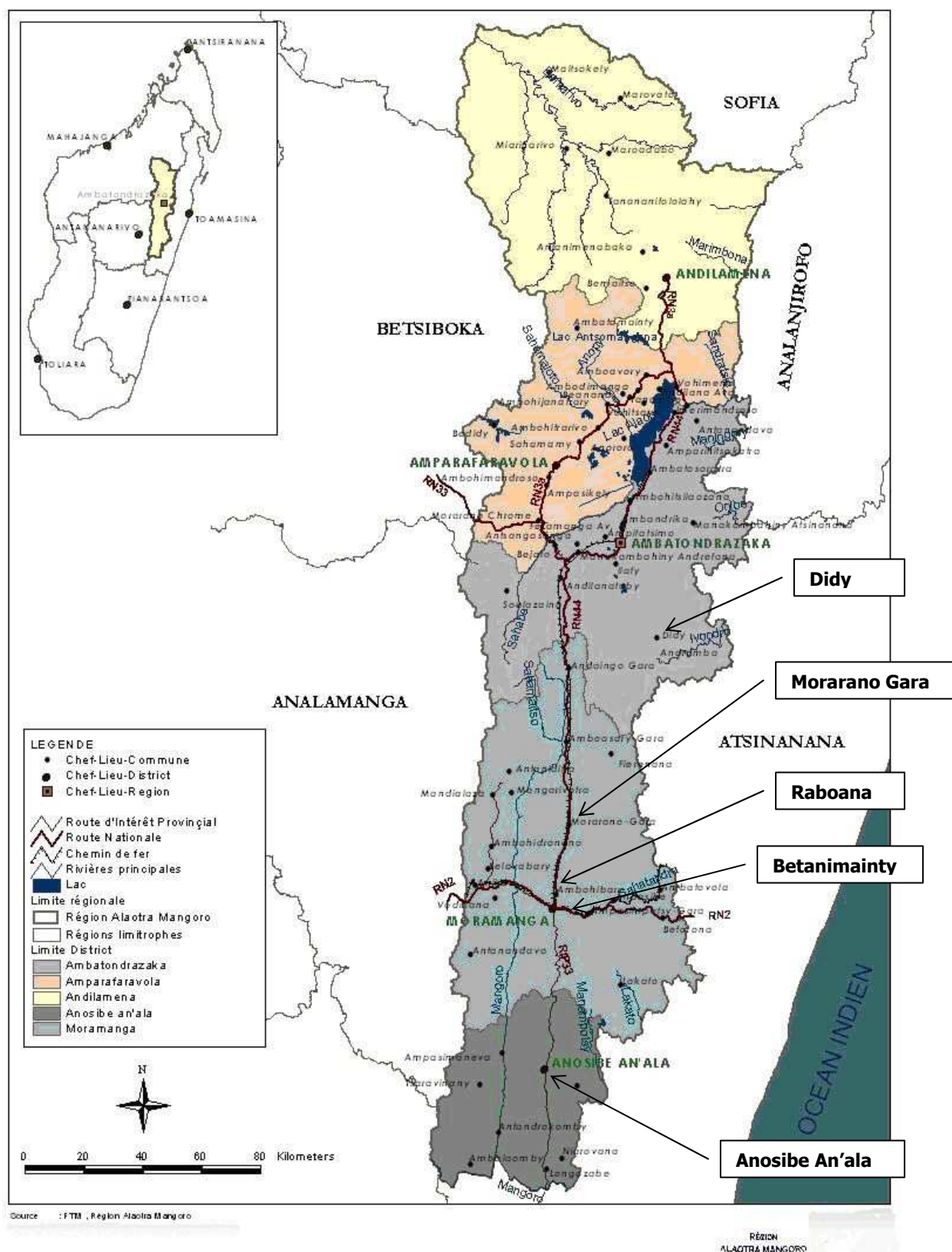
Source : Service de la météorologie Ampandrianomby





Carte n° 1: Localisation générale des zones d'études

Source : FTM



Carte n° 2 : Localisation des cinq sites de travail

Source : FTM, Région Alaotra Mangoro

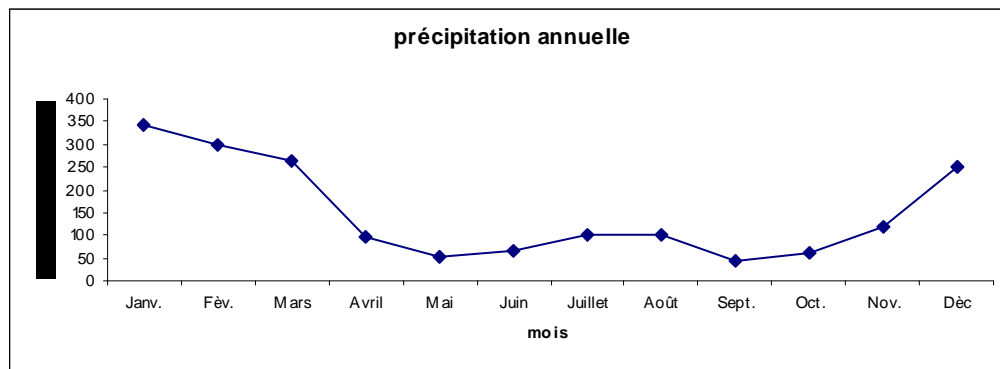


Figure n° 01: Précipitation annuelle dans la région d'Ampasina - Betanimainty

La valeur normale des précipitations est de 1749,6 mm/an avec 208 jours de pluies.

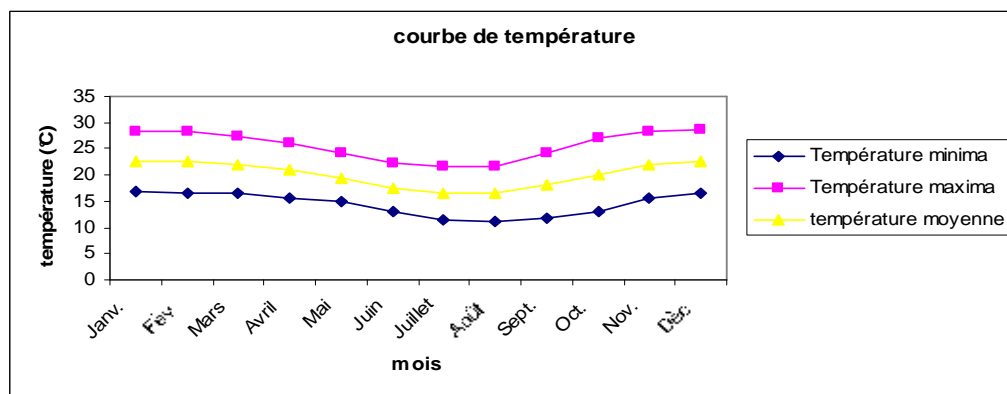


Figure n°02 : Courbe de la température annuelle dans la région de Ampasina – Betanimainty

Les températures varient entre 10°C et 20°C durant les mois les plus froids (Juillet et Août) et entre 16°C et 26°C aux mois les plus chauds (Janvier et février). Ainsi, la température moyenne annuelle est de 18,4°C.

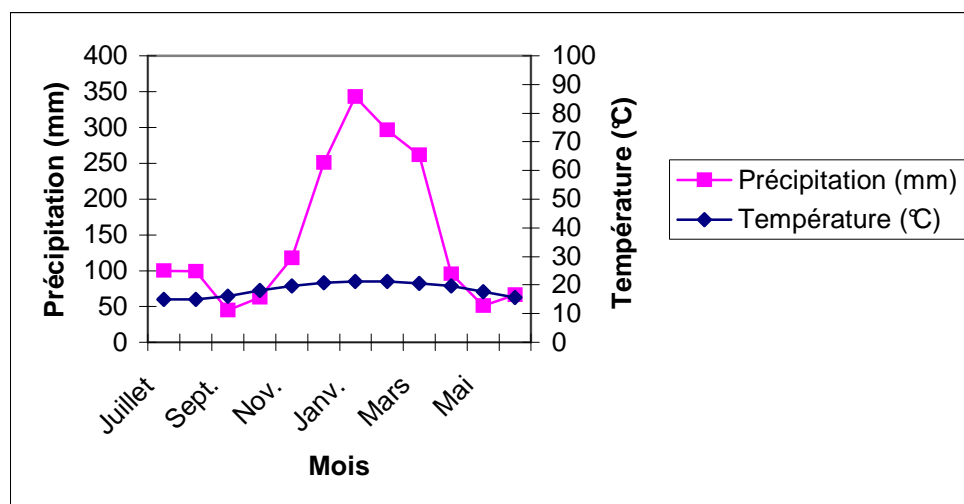


Figure n° 03: Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région Ampasina-Betanimainty.

D'après ce diagramme, la région jouit d'un climat tropical, chaud et humide, caractérisé par des précipitations élevées.

La saison sèche n'est pas très marquée car elle est atténuée par des précipitations occultes qui se présentent sous forme d'averses, de crachins ou de brouillards matinaux.

Il y a deux mois écologiquement secs le mai et l'octobre. Les mois les plus pluvieux se rencontrent en décembre, janvier, février, mars, avril. Et le mois de décembre jusqu'au mois d'avril présente la saison perhumide.

### III-2-2- Didy

Dans la forêt de Didy, nous avons fait la collecte des rameaux pour le bouturage.

La forêt de Didy est situé à 53Km au Sud-Est d'Ambatondrazaka, entre les longitudes 48°33' et 48°48' Est et les latitudes 17°55' et 18°27' Sud.

#### ○ Hydrographie :

Le relief forme dans ses bassins versants un réseau de nombreux cours d'eau dont les plus importants sont la *Sahabe*, la *Lohafasika Sahasomanga*, la *Maningory*, la *Lovoka* se déversant vers la Maningory plus en amont de l'exutoire

#### ○ Climat :

La forêt de Didy est exposée aux alizés humides de l'Océan Indien.

Les données climatiques de la commune rurale de Didy est données par la station météorologique Ampamdrianomby et est récapitulé dans le tableau 03.

**Tableau n°03 : Moyenne de température et de précipitation mensuelles de la site de Didy. Période 1951 – 1980**

Mois	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc
Precipitations (mm)	219,9	143,2	174,8	48,1	34,4	46,5	51,5	57,3	26,9	43,8	16,7	189,9
Nombre de jours de pluie	15,6	13,3	16,1	10,1	11,0	12,8	14,8	13,7	9,4	8,4	10,9	13,7
Precipitation max de 24h	147,7	146,4	147,8	56,0	36,7	32,9	20,1	26,4	27,7	60,5	83,3	82,2
Température moyenne	23.1	22.3	22.7	22.6	21.1	17.2	17.2	16.4	17.6	19.7	22.4	23.3

Source : Service de la météorologie Ampamdrianomby

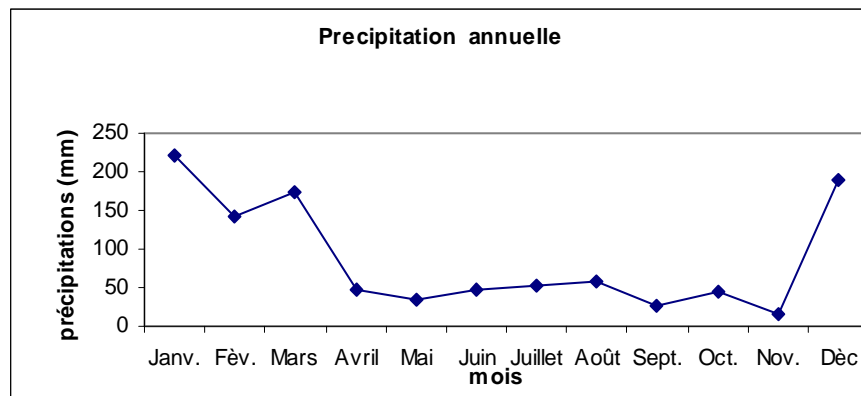


Figure n°04 : Précipitation annuelle dans la région de Didy

Les pluies sont régulièrement réparties toute l'année et il n'y a pratiquement pas de saison sèche.

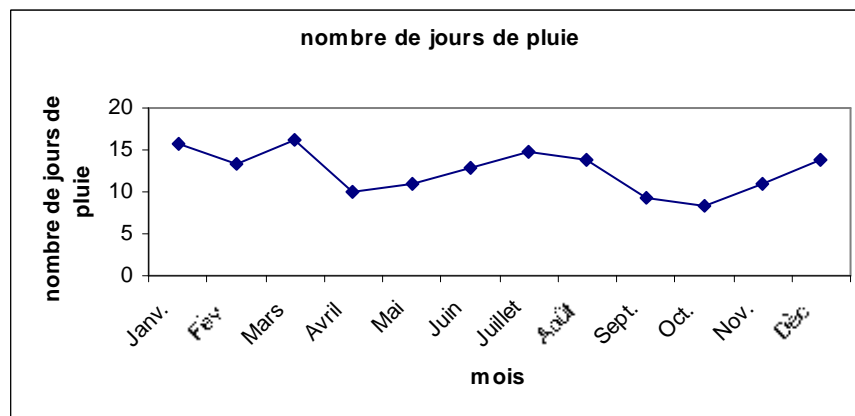


Figure n°05 : Nombre de jours de pluie par an dans la région de Didy.

Les mois les plus pluvieux se rencontrent en Décembre, Janvier et Mars. Les mois les moins pluvieux se situent en Septembre et Octobre.

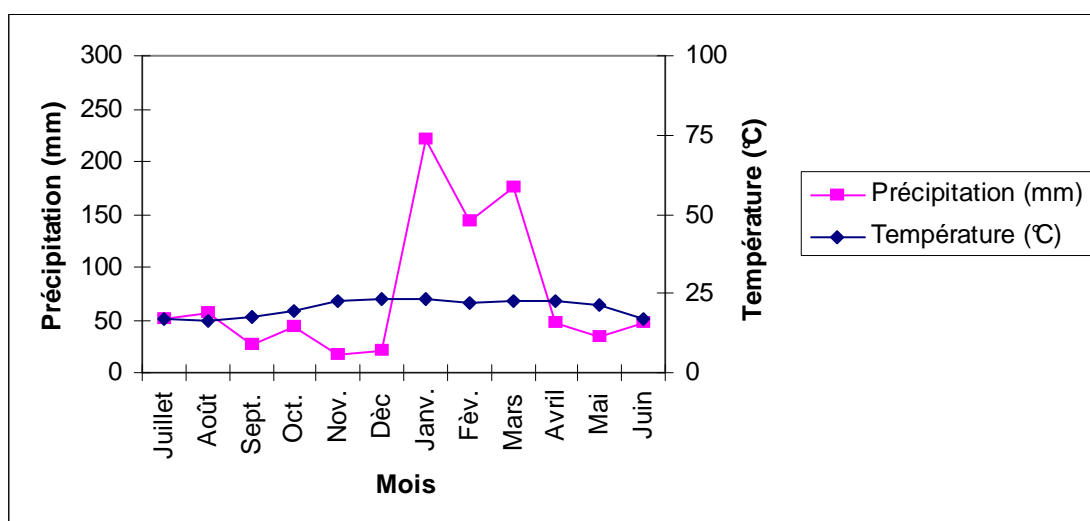


Figure n° 06 : Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région de Didy

Cette figure montre que la région présente trois saisons distinct :

- la saison perhumide de trois mois qui s'étend entre janvier, février, mars.
- La saison humide du juillet à août.
- La saison sèche marquée au mois septembre, octobre, novembre et le mois de mai, juin.

○ **Relief :**

A Didy, le relief est très accidenté sur un sol ferralitique rouge. Il se présente sous la forme d'une succession de crêtes de 1450 m d'altitude et des vallées encaissées à moins de 700 m d'altitude. (RANDRIAMPARANY, 2005)

○ **Topographie :**

Dans le site de Didy, on trouve les cinq classes topographiques tels que les bas-fonds, les versants convexes, les versants concaves, les sommets obtus, les sommets aigus.

\*Dans les bas-fonds, se rencontre un sol hydro morphe minéral ou peu humifère ;

\*Dans les versants convexes, s'observe un sol ferralitique brun-jaune faiblement déssaturé, remanié ;

\*Dans les versants concaves, un sol férralitique brun ou rouge humifère modal se remarque

\*Sur les sommets aigus, se trouve un sol ferralitique brun, jaune ou rouge ;

\*Sur les sommets obtus, le sol est de type ferralitique fortement déssaturé et rajeuni. (RANDRIAMPARANY, 2005).

### **III-2-3 Anosibe an'Ala**

La forêt d'Anosibe an'Ala se trouve à une latitude Sud de 19°25'60'' à une longitude Est de 48°13'0'', d'altitude de 798m dans la forêt d'Ankazomanitra (PK 47). Les collines sont bordées de jeunes jachères, limitant les ébauches de forêts qui se font de plus en plus rares.

○ **Topographie :**

La topographie est homogène, caractérisée par des versants à pente forte >50% en général, et des dépressions marécageuses occupant du Nord au Sud le revers des escarpements

○ **Hydrographie :**

*Les fleuves alimentent le site d'Anosibe an'Ala en traversant la longueur de la sous-préfecture. Les principales rivières sont : Mangoro, Menakoranga, Sandranora et Menambolosa. A noter l'existence de nombreuses chutes dans le district :*

*Andriamamovoka dans la commune de Longozabe, Namonoana dans la commune de Ambalaomby, Chute de la mort dans la commune d'Anosibe An'Ala.*

○ Climat :

Les données climatiques du site d'Anosibe an'Ala provenant du service de la météorologie à Ampandrianomby sont résumées dans le tableau n° 04.

**Tableau n° 04 : de précipitation mensuelles de la site d'Anosibe an'Ala. Période 1961 - 1990**

Mois	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc
Precipitations (mm) 1972	131,8	360,3	518,7	96	121,9	812	140	62,5	41,8	119	293	256
Precipitations (mm) 1973	522,5	469,4	74,6	84,4	59,4	450	212,5	122,6	19,4	0	12,6	145,0
Température (°C)	23.3	22.7	22.4	21	20.2	17.5	15	16.6	18.6	20.1	21.4	23.2

Source : Service de la météorologie Ampandrianomby

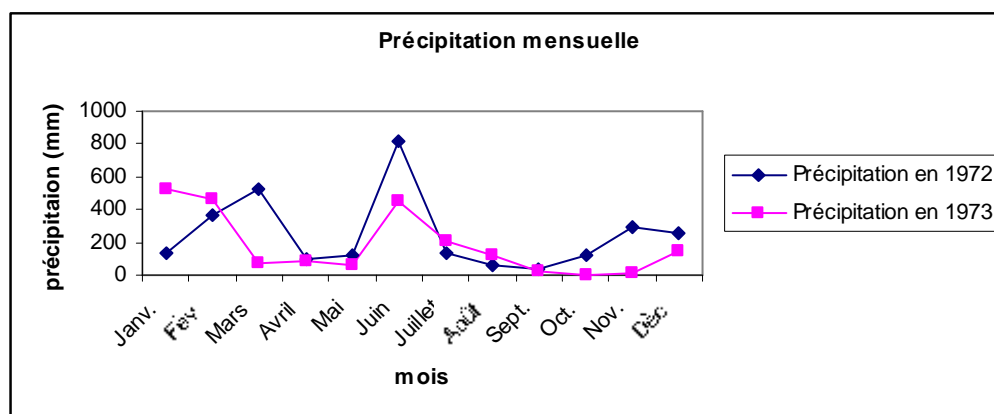


Figure n° 07: Courbe de précipitation mensuelle dans la région d'Anosibe an'Ala.

La saison pluvieuse débute en janvier et se termine en Mars puis en juin, juillet.

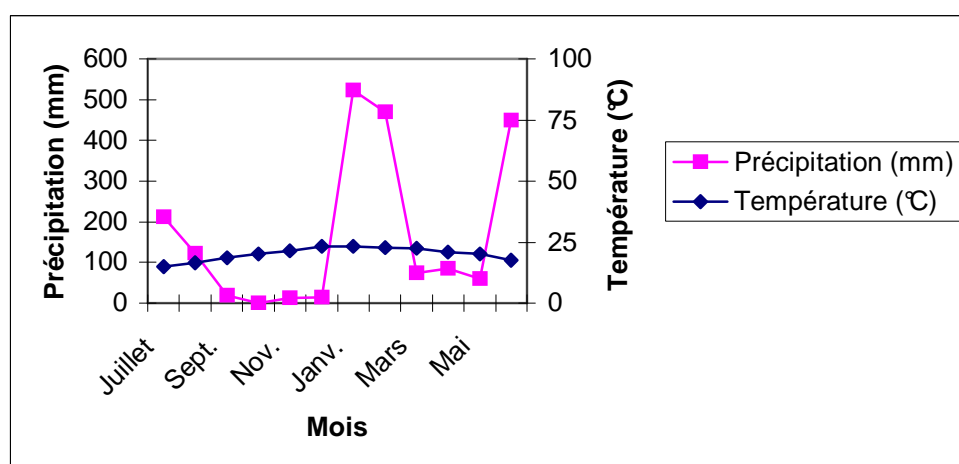


Figure n° 08: Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région d'Anosibe an'Ala

La saison perhumide s'étend le janvier, février, mars, mai, juin dont la précipitation dépasse 100mm/mois et peut atteindre 360mm.



La saison sèche est marquée pendant le mois d'octobre, novembre, décembre, mai.  
Les mois le moins pluvieux se trouvent juillet.

### III-2-4 Raboana

La forêt de Raboana est un des lieux de collectes des rameaux pour le bouturage. Elle est située à la longitude Est de 48°17' et à la latitude Sud de 18°40', à 18Km à l'Est de la commune rurale de Morarano-Gara nord de Moramanga. Ce site à une altitude de 1019m dans la forêt de Maroala.

La forêt de Raboana est limitée par trois villages : à l'Est le village d'Ifempona, à l'Ouest celui de Maroala, et au Sud le village de Beanamalao.

#### ○ Climat :

La forêt de Raboana a un climat tropical humide chaud.

Les données climatiques du site de Raboana provenant du service de la météorologie sont résumées dans le tableau 05.

**Tableau n°05: Moyenne de température et de précipitation mensuelles de la site de Raboana. Période 1968 – 1988**

Mois	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc
Precipitations (mm)	281,2	284,0	209,3	63,3	27,5	27,0	37,7	30,4	9,4	77,4	110,0	228,8
Nombre de jours de pluie	15,4	14,8	16,9	9,6	8,6	10,7	12,2	10,9	4,7	8,1	8,6	16,6
Precipitation max de 24h	123,0	137,0	180,7	63,0	42,0	10,6	15,0	24,5	15,0	83,0	88,0	101,6
Temperature min	16,8	16,7	16,6	15,6	14,9	12,9	11,4	11,2	11,8	13,2	15,7	16,7
Temperature max	28,4	28,4	27,3	26,2	24,2	22,3	21,5	21,6	24,1	26,9	28,3	28,6
Temperature moy	22,6	22,6	22,0	20,9	19,5	17,6	16,5	16,4	18,0	20,0	22,0	22,6

Source : Service de la météorologie Ampandrianomby

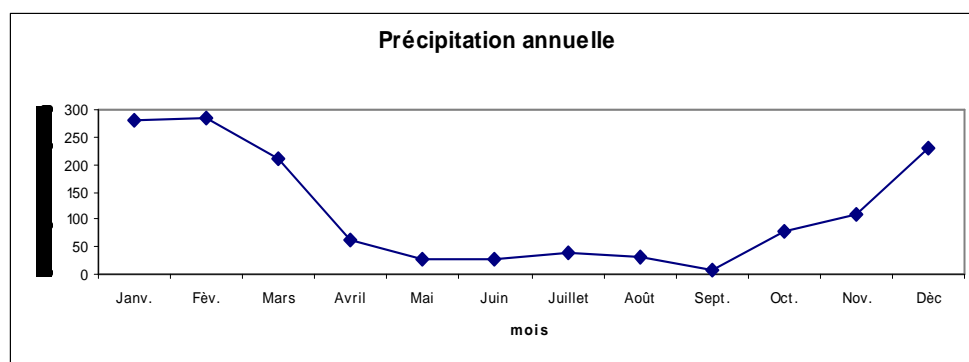


Figure n° 09: Précipitations annuelles dans la forêt de Raboana.

La saison de pluie dure le mois d'Octobre jusqu'au mois d'Avril au cours de laquelle il y a des averses brutales érosives des pluies cycloniques.



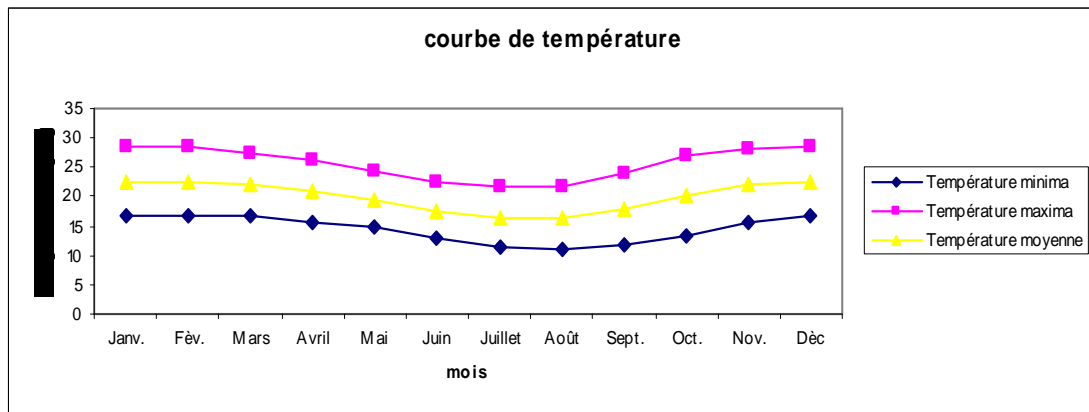


Figure n° 10: Températures annuelles dans la région de Raboana

La température la plus élevée se situe le plus souvent en Janvier tandis que Août demeure le mois le plus froid.

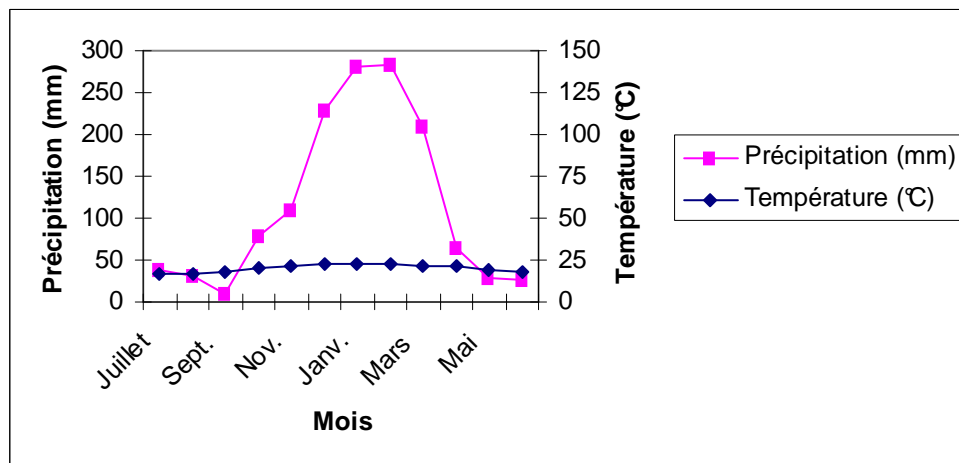


Figure n° 11: Diagramme ombrothermique de GAUSSEN de la région de Raboana

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

- La saison perhumide de trois mois qui s'étend entre janvier et mars.
- La saison sèche de mai, juin, juillet, août, septembre.
- La saison humide de novembre, décembre, avril.

#### ○ Hydrographie de la forêt de Raboana :

La forêt de Raboana est traversée par un fleuve appelé « Vohitra ». Cinq petits ruisseaux se déversent dans ce fleuve : ce sont les ruisseaux *Sahatandra*, *Antsapazaka*, *Sahamarirana*, *Sandrangato* et *Ranomena*.

○ **Relief :**

Comme la forêt de Raboana appartient à la région de Moramanga, le relief « polyédrique » présente des dénivellations considérables (50 à 100m) entre les crêtes et les talwegs. (ANONYME ; 2003).

○ **Topographie :**

La topographie de la forêt de Raboana est homogène, caractérisée par des versants à pente forte (>50%) en général et des dépressions marécageuses. On trouve les bas-fonds, les versants convexes, les versants concaves ; les sommets obtus, les sommets aigus.

### **III-2-5 Morarano**

La forêt de Morarano appartient à la région de Moramanga, située à 18°13'00'' de latitude Sud et 48°20'00'' de longitude Est.

Sa topographie est caractérisée par un relief extrêmement accidenté. Ce relief est caractéristique de la cote Est malgache.

○ **Hydrographie :**

Caractérisé par le fleuve de *Vohitra* qui est situé à l'Est de Morarano-gare et par cinq rivières : *Sahatandra* affluent de *Vohitra*, *Antsapazana*, *Sahamarirana*, *Sandrangato* et *Ranomena*.

○ **Climat :**

La région de Morarano est toujours sous l'influence de l'alizé venant du Sud-Est de l'Ile. Elle subit les mêmes caractéristiques climatiques de l'Est : climat tropical de type humide.

Le tableau n° 06 montre les caractéristiques climatiques de cette région.

**Tableau n° 06 : Moyenne de précipitation mensuelles de la site de Morarano. Période 1961- 1990**

Mois	Janv.	Fèv.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc
Precipitations (mm)	203,9	208,0	159,5	51,4	14,3	11,9	18,1	12,5	10,7	47,2	143,0	258,4
Nombre de jours de pluie	12,1	13,2	12,1	4,5	3,0	4,5	6,6	4,1	2,0	4,6	9,3	14,2
Precipitation max de 24h	135,2	104,4	142,4	78,6	37,7	10,4	25,8	25,3	20,2	65,6	72,1	106,0

Source : Service de la météorologie *Ampandrianomby*

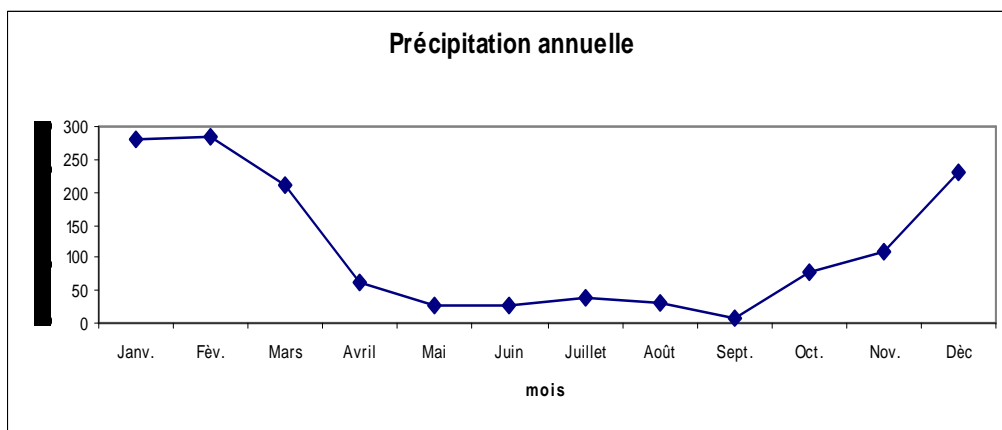


Figure n° 12: Précipitations annuelles dans la région de Morarano

La saison pluvieuse débute en Novembre et se termine en Mars. Pendant cette période, la précipitation dépasse 100mm/mois et peut atteindre à 258,4m.

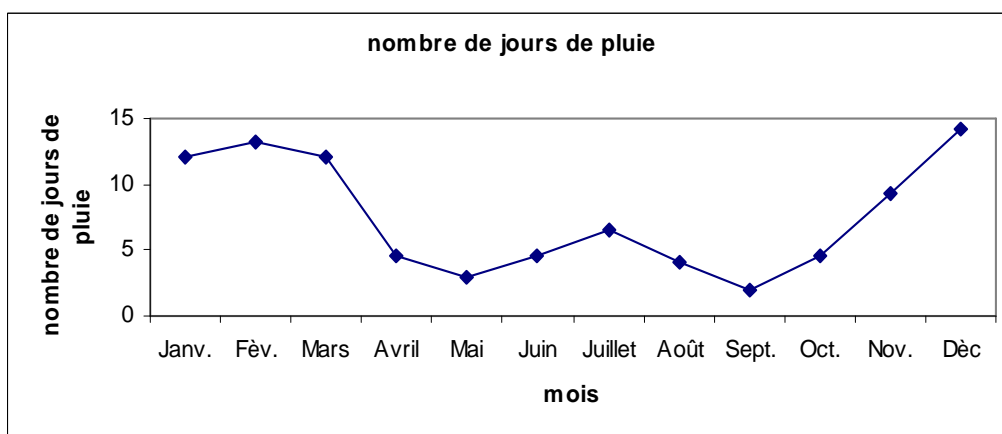


Figure n° 13: Nombre de jours de pluie par an dans la région de Morarano

Les mois les plus pluvieux se rencontrent en Novembre, Décembre, Janvier, Février et Mars.

Les mois les moins pluvieux se trouvent en Septembre et Octobre.

La pluie tombe 90 jours sur 365 jours.

À la vue de la présentation des climats dans ses différents sites, les cinq zones d'études ont les mêmes climats.

#### **IV- GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET LA DISTILLATION**

##### **IV- 1 Définition :**

L'Huile Essentielle est un produit volatil, liquide ou semi-liquide, composé de molécules aromatiques sécrétées par certaines plantes ou certains arbres.

L'huile essentielle est ce qui donne le parfum d'une rose, d'un pied de menthe, d'une feuille de laurier, de la sève d'un pin, d'une branche de thym ou encore d'une racine comme la carotte. L'huile essentielle est donc sécrétée par une partie spécifique du végétal (graine, fleur, feuille, fruit, écorce, pépin, bourgeon, aiguille, racine, fève) ou parfois par la plante entière. Les aromathérapeutes utilisent ces huiles pour leurs caractéristiques olfactives comme pour leurs vertus curatives.

#### **IV-2 Notion de Qualité sur les huiles essentielles:**

Il faut attacher une très grande importance à la qualité de l'Huile Essentielle utilisée, qui doit d'être pure à 100%. L'identification peut être complète si le nom courant, la partie utilisée, la variété botanique (en latin), la région et le pays d'origine de la plante, ainsi que la mention "Huile Essentielle 100% pure et naturelle" sont bien précisés.

Plusieurs facteurs déterminent la qualité d'une huile essentielle : la variété botanique, l'origine de la plante, le matériel végétal, les conditions de la collecte et le processus de distillation. (RAMANOELINA, 1997)

##### **IV-2-1 Variété botanique**

La composition chimique d'une huile essentielle varie en fonction de la variété botanique puisque la variabilité chimique est d'origine génétique. Ainsi, une dénomination de toutes les espèces botaniques permet d'identifier chaque type de plante. Les types chimiques présentent les mêmes caractères physiologiques mais fournissent des essences de composition différente.

Le biotope incluant les conditions climatiques, la nature et la composition du sol, peut influencer la nature et la qualité de l'huile essentielle produite. Mais, cette variation peut aussi être perçue selon les systèmes cultureux (mode de culture, utilisation des types d'engrais, etc.) Ainsi, il est recommandé de préciser la localisation de la zone de collecte de chaque plante pour mieux étudier la composition chimique de l'huile essentielle.

##### **IV-2-2 Matériel végétal**

Les essences peuvent être produites par diverses parties de la plante (feuilles, fleurs, racines, écorces) et n'ont pas les mêmes compositions pour chaque partie. D'où l'intérêt de définir précisément le matériel végétal utilisé.

##### **IV-2-3 Conditions de collecte**

L'huile essentielle peut présenter une différence de composition selon la saison. Il peut aussi y avoir une variation de la composition entre un matériel végétal frais et un matériel végétal ayant déjà subi des traitements tel que le séchage.

#### **IV-2-4 Processus de distillation**

Le processus de distillation joue un rôle important dans la maîtrise de la qualité d'une huile essentielle. Un produit obtenu par hydrodistillation ne sera pas identique à celui qui provient d'une extraction par des solvants organiques.

#### **IV-3 Propriétés des Huiles Essentielles:**

Les propriétés de l'huile essentielle se distinguent selon l'importance de tel ou tel élément présent dans sa composition.

##### **IV-3-1 Propriétés organoleptiques :**

\* **Odeur** : Respirer l'odeur agréable d'une huile essentielle procure une sensation de bien-être, doublée d'un effet sur la santé. En effet, toutes les huiles essentielles ont une ou plusieurs vertu(s) particulière(s).

L'odeur de l'huile essentielle est appréciée par trois notes de bouquet d'une huile essentielle :

- ❖ Note de tête : c'est l'odeur la plus volatile donc se perçoit directement,
- ❖ Note de cœur : c'est la note intermédiaire stimulante perçue à un moment donné,
- ❖ Note de fond : c'est le principal « fixateur », donc le moins volatil en tenant prisonnier les odeurs éphémères, en ralentissant son émission. Cette odeur met donc du temps pour se dégager.

\* **La couleur** : La couleur est difficile à déterminer à l'œil nu sauf en présence d'une solution étalon. L'évaluation de la couleur se fait par le degré de ressemblance entre la couleur du produit étalon et celle de l'essence.

La couleur de l'huile essentielle varie de l'incolore – jaune au marron.

\* **L'aspect** : La mobilité, la limpidité, la viscosité déterminent l'aspect de l'huile essentielle.

Mais pour le cas de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica*, les propriétés organoleptiques sont comme suit:

- Aspect : liquide mobile limpide
- Couleur : transparent à jaune très pâle
- Odeur : terpinolée, légèrement épicée et anisée

##### **IV-3-2 Propriétés physico-chimiques :**

L'huile essentielle de *Ravensara aromatica* obtenue des feuilles a une structure chimique complètement différente des huiles essentielles des autres espèces. Les analyses montrent ses composants majeurs : limonène, sabinène, myrcène, linalol, méthyl chavicol, méthyl eugenol, etc. La durée de distillation et la partie de la plante distillée joue un rôle important dans sa composition chimique.

Le tableau n° 07 résume les constituants trouvés dans l'huile de *Ravensara aromatica* extraite à partir des feuilles.

**Tableau n° 07: Exemple de composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Ravensara aromatica*. (ANDRIANOELISOA *et al.* 2006)**

Constituants	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
$\alpha$ -thujène	0-0,2	0-0,2	1,2-1,3	1,2-1,6
$\alpha$ -pinène	0-0,4	0,2-1,2	3,9-4,5	5,6-8,1
Camphène	Tr-0,4	0-0,1	Tr	0-0,8
$\beta$ - pinène	0-0,5	0,2-0,6	2,7-2,9	3,9-7,7
Sabinène	Tr-3,4	0,4-0,5	16,8-19,4	<b>25-34,4</b>
Myrcène	0-0,5	0,2-0,4	2,8-3,2	3,9-7,7
$\alpha$ -phellandrène	Tr-0,3	0,1-0,2	1,2-1,3	2,5-3,4
$\alpha$ -terpinène	Tr-0,8	4,6-7,8	<b>25,3-27,7</b>	0,9-2,8
Limonène	Tr-4,2	0,7-4,5	14,8-21,8	7,2-8,5
$\gamma$ -terpinène	0-0,1	0,7-1,6	5,7-5,9	1,9-4,4
Oxyde de trans-linalol	-	-	0-0,4	Tr-1,5
p-cymène	-	-	0,7-0,8	-
Linalol	0,7-1,6	0,4-1,9	3,3-4,5	6,5-21,4
Cis-p-2,1-menthénol	-	-	0-0,3	0-0,6
Trans-p-2,1-menthénol	0-0,1	-	0-0,2	0-0,4
Bornéol	0-0,1	-	0-0,5	-
$\beta$ - caryophyllène	-	-	-	-
Terpinène-4-ol	0-2,2	0,6-0,7	7,0-7,2	6,2-12,0
$\alpha$ -humulène	0-0,1	-	-	-
Méthyl chavicol	<b>90,5-94,5</b>	2,5-4,5	1,4	1,8-5,0
Piperitone	-	-	0-0,2	-
Germacrène-D	Tr-1,4	-	-	1,5-2,2
Methyl eugénol	0,1-0,9	74,4-81,6	Tr-1,1	0,3-1,3

Tr : trace

#### **IV-4 Principales indications des huiles essentielles**

L'huile essentielle de Ravensare est d'une grande efficacité contre les maladies virales, infectieuses et bactériennes. Grâce à ses propriétés immunostimulantes, elle protège l'organisme contre la grippe, la varicelle, l'hépatite virale, la coqueluche, la mononucléose infectieuse, ou encore l'angine et d'autres infections concernant les voies respiratoires comme la sinusite, la bronchite, le rhume ou la toux. L'huile de Ravensare est également stimulante, et aide à combattre la fatigue physique et nerveuse. De même, le stress et l'insomnie seront vaincus par ses vertus apaisantes qui peuvent aussi agir contre les douleurs articulaires, rhumatismales et musculaires.

#### **IV-5 Les Modes et Voies d'Utilisation**

On peut utiliser les huiles essentielles de manière différente :

##### **IV-5-1 En usage externe**

- La Friction ou le Massage : Massages et frictions de la colonne vertébrale et du plexus contre le stress, de la nuque et de la colonne vertébrale contre la fatigue (associée à du romarin), des avant-bras, de la nuque et de la poitrine contre la grippe (associée à du Niaouli). 1 goutte (+ 1 goutte de Niaouli) contre l'herpès. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser une huile végétale comme base (huile de noisette, jojoba ou autre).

- Le Bain Aromatique: Comme les Huiles Essentielles ne sont pas solubles dans l'eau, il faut absolument utiliser un dispersant telle que l'huile végétale (huile d'amande douce ou autre), une base neutre pour bain ou tout simplement le shampoing.

##### **IV-5-2 En usage interne:**

Associée à du Niaouli ou à de l'Eucalyptus, en inhalation ou diffusion contre la grippe et les affections des voies aériennes (1 à 2 gouttes trois à quatre fois par jour).

- Bain de Bouche ou Gargarisme

- Ingestion par Voie Buccale: elle est réservée à la prescription médicale.

- La Voie Rectale et Vaginale: utilisation de suppositoire ou d'ovule prévu à cet effet.

#### **IV-6 Intérêts industriels des huiles essentielles**

#### **IV-6-1 Parfumerie :**

A Madagascar, les plantes à parfum telles que *l'Ylang-ylang*, *le Girofle*, *la Basilic*, *la Vanille*, *le Palma rosa* jouent un rôle important dans l'économie nationale puisqu'elles sont exportées à des prix élevés pour la composition en parfumerie « Haut de Gamme ». (RAMANOELINA, 1997)

Une goutte d'huile essentielle diluée dans un parfum lui ajoute une note supplémentaire. On peut effectuer la même démarche avec une absolue.

#### **IV-6-2 Cosmétologie :**

Diluée dans une crème de soin, une huile essentielle apporte ses propriétés au soin hydratant et parfume la crème agréablement.

Lorsqu'on applique les huiles essentielles sur la peau, elles pénètrent dans les tissus et équilibrent l'organisme en profondeur. Au besoin, elles vont stimuler les reins ou le foie, favorisant ainsi l'élimination des toxines. (HELVET, 2000), (VANHOVE *et al.*1993) Certaines huiles essentielles peuvent être utilisées au cours de bains. Selon leurs propriétés, ce bain devient relaxant, stimulant, apaisant, astringent, etc.

#### **IV-6-3 Arômes alimentaires :**

Dans le contexte économique mondial actuel, la valorisation des plantes aromatiques locales par la production et la commercialisation des huiles essentielles ou essences végétales peuvent réellement constituer pour les paysans un outil de développement durable et même de lutte contre la pauvreté.

Les arômes sont des ingrédients destinés à donner un goût, une odeur aux denrées alimentaires (boissons, produits laitiers, confiserie, biscuiterie, plats cuisinés, etc.). (KOUMAGLO, 1730).

Les huiles essentielles d'agrumes jouent un rôle capital dans l'aromatisation des boissons douces, des apéritifs et liqueurs, des crèmes glacées, des confiseries, des biscuits, des préparations pour desserts, des gommes à mâcher. (RAMANOELINA, 1997)

#### **IV-6-4 Aromathérapie :**

L'aromathérapie (étym : lat "aroma", grec "arôma" = arôme; grec "therapeia" = soin, cure) est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes (soit essences soit huiles essentielles). L'aromathérapie est donc une méthode thérapeutique à base d'huiles essentielles. Ces huiles sont extraites des plantes par distillation, macération, ou pressurage. Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odoriférants, en l'occurrence ici, les Huiles Essentielles.

Les aromathérapeutes utilisent ces huiles pour leurs caractéristiques olfactives comme pour leurs vertus curatives.

L'huile essentielle des fleurs de lavande est très recherchée en aromathérapie, en parfumerie et en cosmétique. Elle a une fonction stimulante, antiseptique et apaisante pour la peau. (KOUMAGLO, 1730)



L'huile essentielle de *Ravensara aromatica* Sonnerat (feuilles) est un antiviral, anti-infectieux, antibactérien, antiseptique et analgésique. Cette huile est particulièrement remarquable en tant qu'antiviral, contre les herpès en particulier, les hépatites et entérites virales. Comme indications usuelles, cette huile est un remède contre la fièvre, les fatigues musculaires, les gripes, la zona, l'eczéma, les maladies articulaires, les infections basses, le choléra, les sinusites, les bronchites, et les rhinites. Cette huile essentielle est également très efficace contre le stress, les éruptions, les foulures et l'insomnie. (FRANCHOMME, 1995), (GROEBEL *et al.* 1970).

#### **IV-7 Conditionnement et stockage des huiles essentielles:**

Les huiles essentielles sont des produits semi-finis nécessitant d'être conditionnés pour conserver les caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques et les constituants chimiques. Elles sont donc des produits qui se décomposent facilement. Elles doivent être stockées et conservées au sec, 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'altération à la lumière, et doivent être conservées dans un endroit frais à l'abri de la lumière et de la chaleur.



Photos n°05: Flacon de conditionnement d'huile essentielle

Source : Cliché de l'auteur

#### **IV-8 Procédés d'extraction d'huile essentielle:**

Il y a plusieurs techniques d'extraction d'huile essentielle selon la partie du végétal traité, selon sa fragilité, selon ses caractéristiques botaniques, tel l'extraction par enfleurage, par pression, par CO2 liquide. Cf annexe n°01

Deux modes d'extraction sont les plus utilisés, ce sont l'extraction par solvant et l'extraction par entraînement à la vapeur.

#### **IV-8-2 Extraction par entraînement à la vapeur :**

La technique la plus courante est la distillation à la vapeur d'eau. Les parties de la plante à distiller sont placées dans une cuve traversée par de la vapeur d'eau. L'huile essentielle du végétal est emportée avec la vapeur d'eau et forme un liquide que l'on fait ensuite refroidir. Etant de densité plus faible que l'eau, l'huile essentielle surnage et il est alors possible de la récupérer en la séparant de ce que l'on appelle l'hydrolat. Cette technique d'extraction de l'huile essentielle garantit une excellente qualité du produit et préserve toutes ses vertus.

#### **IV-8-1 Extraction par solvant :**

La technique de l'extraction par solvant remplace aujourd'hui celle de l'enfleurage. Elle aboutit également à l'obtention d'absolues très recherchées par les parfumeurs pour la pureté de leur puissante odeur.



Photos n°6: Huile essentielle de *Ravensara aromatica*  
Source : Cliché de l'auteur

### **CONCLUSION PARTIELLE**

Actuellement, les principaux débouchés de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* n'acceptent qu'un certain type chimique. Pour résoudre ce problème, l'étude de l'évolution des chémotypes selon les traitements sylvicoles a été menée.

Endémique de Madagascar, *Ravensara aromatica* Sonnerat, un arbre de hauteur de 20 à 30m avec une écorce de couleur rougeâtre, peut être extraite à partir de ses feuilles et ses écorces. Cet arbre s'acclimaté très bien dans un climat tropical humide.

Les forêts d'Ampasina-Betanimainty, Didy, Anosibeana'Ala, Raboana et celle de Morarano se trouvent sur la côte Est de Madagascar. Elles sont caractérisées par une abondance de pluie et une température quasi stationnaire.

La qualité des huiles essentielles dépend de plusieurs facteurs. A part ses vertus curatives, la parfumerie, l'industrie alimentaire en profitent d'avantages. Son extraction peut être faite selon diverses méthodes, mais les plus utilisées sont l'hydro distillation et l'extraction par solvant.

Ces études préliminaires forment la base de ce mémoire et sont nécessaires pour les matériels et méthodes.

# **2<sup>ème</sup> partie : MATERIELS ET METHODES**

## **2<sup>ème</sup> partie : MATERIELS ET METHODES**

### **I- MULTIPLICATION VEGETATIVE DU *Ravensara aromatica* PAR BOUTURAGE**

#### **I-1 Choix de la technique de multiplication végétative**

##### **I-1-1 la méthode de culture :**

A Madagascar, l'exploitation des plantes médicinales se fait encore par cueillette, les essences se répartissant dans la forêt. Aussi, la régénération naturelle n'est plus assurée, et l'obtention des graines s'avère difficile. Et à cela s'ajoute la fructification irrégulière des plantes et la difficulté de germination.

Par la méthode de multiplication végétative, il y a possibilité de sélectionner le matériel végétal à utiliser. Ce choix permet donc la domestication des pieds mères de bonne qualité et surtout la conservation de ses caractères génétiques.

##### **I-1-2 bouturage :**

Le développement de la méthode de propagation végétative, dont fait partie le bouturage, est un outil nécessaire pour la conservation des ressources génétiques et pour l'exécution des programmes de domestication. (DANTHU et al. 2002)

Le bouturage consiste à multiplier certains végétaux à l'aide de fragment de tiges, rameaux, racines détachés de la plante mère et placés dans des conditions telles qu'il développe les organes qui lui manquent afin qu'il devient une plante complète, identique à celle sur laquelle le fragment a été prélevé.

#### **I-2 Objectifs du bouturage**

Le bouturage est un mode de multiplication permettant d'obtenir une nouvelle plante à partir d'un fragment d'un pied mère appelé bouture. En plus d'être un mode de multiplication, c'est aussi un moyen d'obtenir une nouvelle plante, plus vigoureuse, saine, à croissance et fructification plus précoces.

Ce procédé présente certains avantages :

- ❖ Reproduction fidèle
- ❖ Reproduction de plantes ne donnant pas de graines

- ❖ Pour certaines espèces, on obtiendra plus vite des fleurs ou fruits que par semis

### **I-3 Différents types de bouture :**

La bouture est le fragment de végétal, susceptible de s'enraciner. Différentes formes de boutures existent, elles varient en fonction du morceau choisi.

#### **I-3-1 Boutures de fragment souterrain :**

C'est le bouturage à partir d'un fragment de racines ou de rhizomes. Les tronçons sont les plus souvent placés à plat dans ou sur le substrat.

#### **I-3-2 Boutures des fragments aériens :**

\* A partir des rameaux pouvant provenir de branches d'arbres adultes ou de rejets de souche.

Les boutures peuvent être plantées :

- avec ou sans feuilles dont la taille est en biseau
- avec un morceau de rameau porteur (à talon)

Pour les végétaux à feuilles persistantes ou à feuilles caduques mais en végétation, les boutures peuvent être des rameaux feuillés. Donc, il faut limiter l'évapotranspiration en plaçant les boutures turgescentes.

\*A partir des bourgeons ou yeux

Les boutures peuvent avoir un ou deux yeux ou plus et les fragments sont prélevés avec une partie du rameau.

\*A partir des feuilles

Il s'agit de détacher un fragment de feuilles puis le mettre en terre.

La figure n° 12 montre que la bouture herbacée, la bouture bois-tendre, la bouture semi-ligneuse, la bouture ligneuse est le différent type de bouture qu'on peut effectuer. Il est aussi possible de réaliser les boutures sur des rameaux non feuillés, pendant la période de repos de certains arbres.

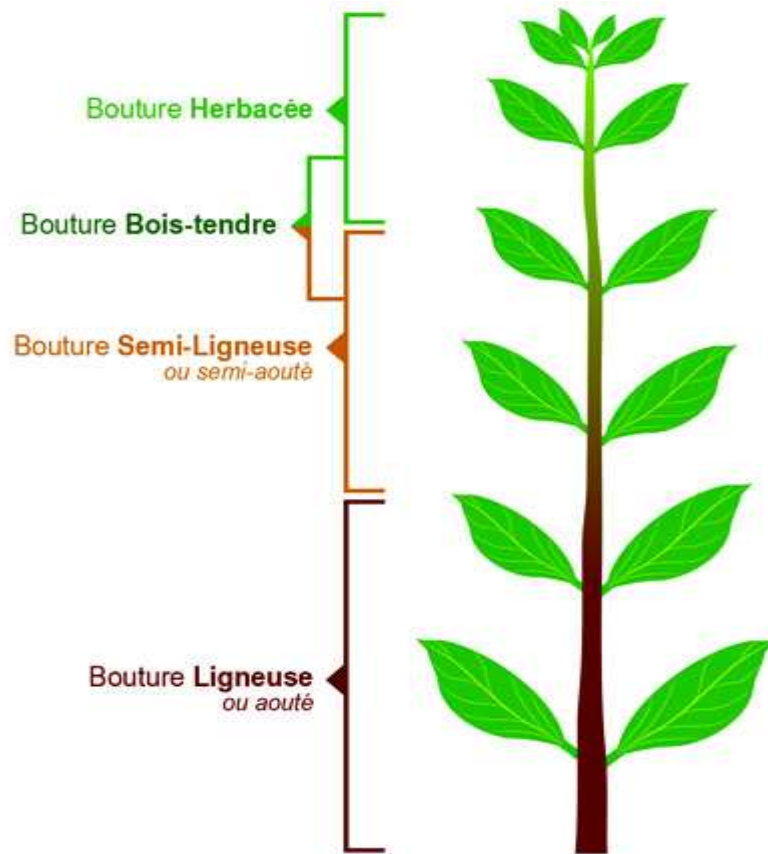


Figure n°14 : Les différents types de boutures

Source : CEDRIC ,2006

a- La bouture herbacée :

Prélevée sur des pieds en pleine végétation sur les parties jeunes de l'arbre, elle peut se pratiquer tout au long de l'année.

b- Les boutures de bois tendre :

Ce type de bouture se fait sur les rameaux verts de l'année, généralement pendant les mois de mai, juin et juillet. (condition climatique de l'Afrique)

c- Les boutures semi ligneuses:

Partie d'un rameau qui commence à subir l'aoûtement (passage de l'état herbacé à l'état ligneux), ce type de bouture s'effectue en fin d'été, début automne.

#### d- Les boutures ligneuses :

Elles se pratiquent sur les arbres très ligneux comme les conifères, généralement en automne ou tout au début de l'hiver.

#### **I-4 type de bouturage effectué :**

On a pratiqué les boutures de fragments aériens, plus précisément, à partir des rameaux provenant de branches d'arbres adultes ou de rejet de souches.

Les boutures sont donc plantées avec un morceau du rameau porteur (à talon). Comme le *Ravensara aromatica* est une plante à feuilles caduques mais en végétation, les boutures peuvent être des rameaux feuillés. Donc, il faut limiter l'évapotranspiration en plaçant les boutures à mi-ombre avec apport d'eau pour maintenir les boutures turgescentes.

#### **I-5 Etapes de bouturage**

Il est préférable de récupérer les rameaux le matin, afin que les tiges soient gorgées d'eau, afin d'éviter leur dessèchement lors de la phase de bouturage. L'étape de bouturage est donnée dans la partie expérimentale.

#### **I-6 Conditions de bouturage :**

##### **I-6-1 Condition de réussite**

Par définition, le bouturage est une opération assez délicate, puisqu'il faut qu'un fragment de plante survive suffisamment longtemps sans aucune alimentation en sève, pour émettre des racines et devenir autonome. Une ambiance assez chaude, humide, sans être détrempée, et une atmosphère confinée favoriseront la reprise des boutures.

##### **I-6-2 Choix du substrat**

Un mélange de sable de rivière et de tourbe humide sera parfait, positionnez les boutures dans un endroit très lumineux mais pas en contact direct avec les rayons du soleil. Le substrat est capital pour obtenir un bon enracinement, plus encore que pour les semis, où les graines possèdent une tendance naturelle à germer. Un milieu léger, humide, souple, poreux, aéré sera recherché. L'émission de racines sur une bouture, phénomène discret, ténu, est en quelque sorte une tentative de survie de la plante. Les minuscules radicelles ont besoin de trouver un chemin facile entre les particules de terre. (CEDRIC, 2006)



L'humidité est également indispensable, car les racines puisent les sels minéraux nourriciers de la plante sous forme soluble.

Le substrat utilisé pour le bouturage est donc voisin, voire similaire à celui du semis.

On utilise un mélange de deux volumes de sable et un volume de tourbe car cette proportion donne la plupart du temps des résultats excellents.

### **I-6-3 Le bon candidat à la bouture**

Une branche, comportant au moins deux nœuds plus le jeune feuilles en formation, et mesurant minimum 3-4 Cm de long, et au maximum une dizaine de cm pour avoir de bonnes chances de réussite. Le problème ne se situe pas directement dans la longueur, mais dans les modifications physiologiques qui en sont corollaires : les canaux qui sucent les nutriments (le pro cambium) vont se lignifier en vieillissant et dériver en canaux secondaires (le cambium) avec un pouvoir d'organogenèse plus faible.

### **I-7 Conditions sous châssis**

L'idéal est de cultiver les boutures en serre, ou dans des pots plastiques recouvert d'un sac plastique perforé transparent.

La réalisation de la bouture est un élément très important pour son enracinement. Cependant, il n'est pas le seul. En effet, les facteurs du milieu comme la température ou la lumière jouent également un rôle.



Photos n°07: Châssis

Source : Cliché de l'auteur

Pour la condition d'un bon enracinement d'une bouture sous châssis, il y a :

- **L'humidité** : arroser au pulvérisateur (plutôt qu'à l'arrosoir) pour garder le sol bien frais.
- **La chaleur** : placer les boutures sous châssis ou tunnel l'hiver, sous film transparent au printemps ou l'été pour créer une atmosphère confinée.
- **La lumière** : toujours la belle saison à mi-ombre (pas de soleil direct) (CEDRIC,2006)



Photos n°08: Bouture de *Ravensara aromatica* sous châssis

Source : Cliché de l'auteur

La température, la lumière et le taux d'humidité joueront un rôle très important pour la réussite des boutures.

## **I-8 Matériel de bouturage**

### **I-8-1 Les rameaux et matériaux utilisés**

Les rameaux sur lesquels sont prélevées les boutures ont été récoltés lors de différentes missions effectuées en forêts naturelles.

L'outillage sommaire consiste en une paire de ciseaux ou un bon sécateur. Mais, il faut toutefois prévoir de bons récipients pour les hormones et surtout le moyen de les couvrir (châssis car le mini serres que l'on trouve dans le commerce ne bénéficient généralement pas

d'une hauteur suffisante) pour abriter les boutures. Il faut, en effet compter au moins 20cm entre le sommet du couvercle et le niveau du substrat.

Il est donc nécessaire, le plus souvent, de se fabriquer un succédané de serre à partir d'une terrine ou d'un pot. Un pulvérisateur de petit volume servira à l'arrosage des boutures et au maintien du degré hygrométrique qui doit être le plus important possible. Une forte condensation le long du tirage du couvercle ou sur le plastique indique que le milieu est favorable.

### **I-8-2 Les hormones**

Les hormones utilisées dans le bouturage sont les auxines qui sont responsables de l'enracinement des boutures.

Les auxines agissent sur plusieurs activités de la plante telle que le développement de la partie apicale, l'inhibition des bourgeons latéraux, l'abscission des feuilles et fruits. Les auxines stimulent aussi la rhizogenèse, l'apparition de racines sur les tiges et autres organes) et se trouvent donc être l'hormone de bouturage par excellence. (HELLER *et al.* 1995)

Les auxines sont constituées par des groupes de substances naturelles, synthétisées à l'extrémité des tiges (dans l'apex) et transportées de manière basipète (migrent vers la base de la plante)

Ce sont donc aussi des groupes de substances qui comprennent :

\* l'Acide Indole Acétique ou AIA qui est un acide faible, ne se dissocie pas facilement dans l'eau. C'est une hormone difficile à synthétiser. (HELLER *et al.* 1995)

\* l'Acide Indole Butyrique ou AIB qui est une hormone de synthèse.

### **I-9 Lieu de collecte de matériel végétal**

La récolte a été effectuée en 3 périodes :

- 14 /03/07 à Ampasina – Région Alaotra Mangoro
- 12/05/07 à Didy – Ambatondrazaka – Région Alaotra Mangoro
- 08/06/07 à Anosibe an'Ala et Raboana - Région Moramanga

Les rameaux sont séparés pied par pied et mis à tremper au fur et à mesure de la récolte dans l'eau courante jusqu'au moment du retour à Antananarivo. Pour garder l'humidité des rameaux, durant le transport, les rameaux sont enveloppés de papiers journaux bien humectés, le tout mis sous sac de jute et généreusement arrosé d'eau jusqu'au moment du bouturage.

Les fiches de collecte sont présentées en annexe n° 02.

## **I-10 Technique expérimentale de bouturage**

### **I-10-1 Récolte du matériel végétal**

Le matériel végétal est constitué de boutures prélevées sur des rameaux issus d'arbres adultes le plus possibles sains, en bon état végétatif de *Ravensara aromatica*. Les boutures sont feuillées, de préférence semi aoûtés, ont de 6 à 7 cm de long et de 5 à 7 mm de diamètre devant comporter au moins 3 nœuds. Sur chaque tige peut se prélever différents types de boutures :

- les boutures terminales de consistance herbacée ;
- les boutures semi ligneuses intermédiaires
- les boutures ligneuses de la partie basale



Photo n° 09: Rameau de bouture de *Ravensara aromatica*

Source : Cliché de l'auteur

### **I-10-2 Préparation du matériel végétal**

Les boutures sont découpées à l'aide de sécateur bien aiguisé pour obtenir une coupe nette. Chaque bouture doit comporter de 2 à 3 bourgeons dont un bourgeon se trouve à la base.

Les boutures sont comportés des feuilles c'est-à-dire une ou deux petites feuilles sont retenues sur chaque bouture pour servir de tire sève et limiter l'évapotranspiration. Les feuilles jeunes sont retenues car elles ont une action positive sur la rhizogenèse. La coupe se fait en biseau pour une meilleure pénétration dans le sol. Elle se fait juste au-dessous d'un bourgeon à la base de la bouture où se formeront les racines. (RAMAROSON, 2006)

### **I-10-3 Conditions de culture**

Les boutures sont mises en place à l'étouffée c'est-à-dire dans des châssis recouverts de feuille plastique pour limiter l'évapotranspiration.

Les châssis sont placés à l'ombre ou recouverts d'ombrière faite de treillis de bambous pour les protéger de la forte chaleur. A l'intérieur du châssis, on met des containers plastiques remplis le substrat composé de 2/3 de terreau et de 1/3 de sable de rivière.

### **I-10-4 Mise en culture des boutures – Obtention de clones de *Ravensara aromatica***

Les boutures sont traitées avec un type de traitement : traitement avec l'hormone AIB 1% sous forme de poudre.

Pour les hormones en poudre, la base des boutures est trempée dans l'hormone avant leur plantation. Le trempage est fait une seule fois à 1 cm de la base. Pour la mise en pots, les boutures sont plantées verticalement, avec un ou deux nœuds enfoncés dans le substrat, en pratiquant au préalable un trou dans le substrat pour éviter d'essuyer etc.....

Le substrat autour de la bouture doit être bien tassé pour éviter les poches d'air. L'arrosage est effectué tout de suite après le repiquage. La température journalière à l'intérieur du châssis se situe entre 18 et 25°C. L'arrosage se fait tous les jours mais il faut éviter l'excès d'eau.

### **I-10-5 Suivi du bouturage :**

Le suivi de l'évolution des boutures se fait quotidiennement. Chaque changement a été noté : nombre de boutures vertes, le nombre des pousses, le nombre des boutures mortes,...

L'observation de l'enracinement se fait à partir du deuxième mois de mise en terre.

Une observation est aussi faite sur les boutures mortes. On note s'il y a déjà formation des bourrelets, de cal, ou même la présence des racines, la présence ou absence de champignons. Et si la bouture est pourrie, on peut dire qu'il y a un excès d'humidité à l'intérieur du châssis. Si elle est sèche, il y a un manque d'humidité.





Photos n°10: Bouture de *Ravensara aromatica*  
enraciné

Source : Cliché de l'auteur



Photos n°11: Bouture de *Ravensara* avec  
des nouvelles feuilles

Source : Cliché de l'auteur

#### **I-10-6 Soins après reprise**

Les soins varient selon les techniques de bouturage. Si, après un mois, les boutures restent vertes, c'est qu'elles sont en train de reprendre ou sont en voie d'enracinement. Il suffit alors de prélever, parmi la population des boutures, un échantillon pour constater l'état du développement des racines.

Les boutures racinées seront soulevées très précautionneusement pour ne pas abîmer les jeunes racines encore très fragiles. En aucun cas, il ne faut tirer sur le plant pour l'extraire du sol. La meilleure technique consiste à utiliser une fourchette ou un petit transplantoir, à le piquer verticalement dans la terrine, puis à lui imprimer un mouvement de bascule vers le bas pour soulever la terre par en dessous.

## **II- IDENTIFICATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Ravensara aromatica***

### **II-1 Analyse sur les rejets et les régénérations par graines**

#### **II-1-1 Echantillonnage:**

Pour faire la distillation, les feuilles sont collectées dans les trois régions différentes : forêt de Besakay, forêt de Bemanja, forêt d'Amparihibe.

Au cours de la descente sur terrain une fiche de collecte a été préparée. Pour bien suivre les lieux, les caractéristiques de l'arbre et l'état de feuilles collectées, le tableau n°08 résume la fiche de collecte sur terrain. Les coordonnées géographiques des échantillons sont données en annexe n° 03.

**Tableau n° 08: Fiche de collecte sur terrain**

Lieu	Arbre	Hauteur arbre rejet ou régénération)	Diamètre (Ø) (de l'arbre (rejet ou régénération)	Feuille			Observation
				Forme	Couleur	Odeur	
Bemanja	BMXrg1	90cm	6cm	Allongée	Vert foncé	-	-
	BMXrg2	1m10	4 à 5cm	Longue, effilée	Vert plus clair	terpénique	-
	BMXrj1	1m10	6cm	Allongée	Vert foncé	-	21cm de Ø de souche
	BMXrj2	1m	5cm	Allongée	Vert foncé	-	21cm de Ø de souche
	BMXrj3	1m	5cm	Grosse, allongée	Vert foncé	-	20cm de Ø de souche
Besakay	BSXrj1	1m15	6cm	Ronde	Vert foncé	-	22cm de Ø de souche
	BSXrj2	70cm	4,5cm	Arrondie	Vert foncé	-	20cm de Ø de souche
	BSXrg1	1m10	7cm	Allongée	Vert foncé	-	-
Amparihibe	AXrj1	72cm	4cm	Allongée	Vert foncé	-	1m de Ø de souche
	AXrj2	1m	6cm	Petite,	Vert foncé	Mét	17cm de Ø

				allongée		Eug	de souche
	AXrj3	90cm	4,5cm	Grosse, arrondie	Vert foncé	-	20cm de Ø de souche
	AX1j4	1m	4cm	Grosse	Vert foncé	-	21cm de Ø de souche
	AXrj5	1m40	06	Grosse, arrondie	Vert foncé	-	21cm de Ø de souche

Mét Eug : Méthyl eugénol

Ø : diamètre

### **II-1-2 Détermination de l'humidité des feuilles**

Les feuilles sont distillées à l'état frais. Le test sur l'humidité est donc nécessaire pour pouvoir contrôler la quantité d'eau dans les feuilles à distiller et la qualité des huiles essentielles obtenu.

Le protocole de détermination de l'humidité des feuilles de *Ravensara aromatica* est donné dans la partie expérimentale.

Comme la récolte des feuilles se fait pendant une mission de quatre jours et la distillation se fait à Antananarivo, on observe une différence d'humidité c'est-à-dire une certaine quantité d'eau libre des feuilles est partie.

### **II-1-3 Distillation**

#### **II-3-1-1 Matériels d'extraction:**

Pour l'extraction d'huile essentielle des différents échantillons de feuille de *Ravensara aromatica*, nous avons utilisé l'appareil d'hydro distillation de la FOFIFA. La fiche de distillation est donnée en annexe n° 04.

L'appareil d'hydro distillation est composé de :

- Un ballon qui permet de contenir les feuilles et l'eau. Le ballon a une capacité de 2 litres.
- Un essencier qui a pour rôle de séparer l'huile essentielle et l'eau distillée.
- Un réfrigérant qui permet de condenser la vapeur contenant l'huile essentielle et l'eau.
- Un tuyau plastique qui permet la circulation de l'eau de JIRAMA dans le réfrigérant.
- Un bec bunsen qui est la source d'énergie pour l'évaporation et est aussi alimenté par un gaz.





Photos n°12: Appareil d'hydrodistillation

Source : Cliché de l'auteur

### **II-3-1-2 Fiche technique de distillation de *Ravensara aromatica* :**

Avant toute distillation, une fiche technique doit être toujours présente pour identifier la qualité d'huile obtenue. La fiche technique de distillation de *Ravensara aromatica* est donnée en annexe n° 05.

## **II-4-1 Détermination des caractéristiques des huiles essentielles**

### **II-4-1-1 Test olfactif**

Dans les quatre régions de collecte, à Besakay, Betanimainty, Amparihibe, Morarano, on a collecté au total 23 échantillons de feuilles de *Ravensara aromatica*. Toutes les huiles essentielles extraites sont analysées par chromatographie en phase gazeuse. Et pour confirmer les résultats, on fait un test olfactif des 23 échantillons des feuilles et des huiles essentielles. Le test olfactif sur les huiles essentielles extraites des feuilles de *Ravensara aromatica* est donné en annexe n°06.

Il s'agit de reconnaître olfactivement la présence d'odeur d'anis dans les feuilles ou dans l'huile. En fait, cette méthode consiste à distinguer les deux types chimiques de l'huile essentielle.

Ce test consiste à classer les échantillons selon leur odeur. La présence à forte concentration de méthylchavicol est détectée par une odeur d'anis prononcée.

Six individus testeurs ont réalisé le test. Chaque sujet doit juste cocher par un plus (+) ou par un moins (-) la case correspondante au code de l'échantillon qui sent l'anis ou non.

Le protocole du test olfactif est donné dans la partie expérimentale.

Et pour les huiles, on utilise une touche (bout de papier) semblable à celle utilisée pour les parfums et portant le code de chaque échantillon.

#### **II-4-1-2 Caractéristiques physico-chimiques**

Vu que la quantité d'huile essentielle extraite est assez petite, l'analyse physico-chimique est limitée à la mesure de la densité et la mesure de l'indice de réfraction.

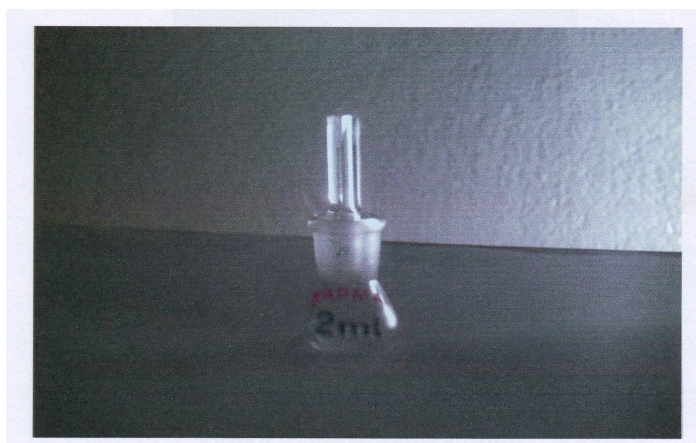
A part la densité et l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, l'indice d'ester, l'indice d'acide sont aussi des propriétés indispensables à la détermination de la qualité d'une huile essentielle.

La mesure du pouvoir rotatoire, l'indice d'ester, l'indice d'acide est donné en annexe n°07

##### **a- Mesure de la densité :**

La densité relative 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 2ml ou 5ml par des pesées successives de volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température 20°C.



Photos n° 13 : Pycnomètre 2ml

Cliché : ANDRIAMIRIJA, 2007

Comme la température dans la salle de laboratoire est voisine de 20°C, on fait le calcul de la densité relative par la relation :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} x \Delta + 0,0012 x \left[ 1 - \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} x \Delta \right]$$

où :

$m_0$  : masse du pycnomètre à vide

$m_1$  : masse du pycnomètre avec l'eau

$m_2$  : masse du pycnomètre avec l'huile

$\Delta$  : densité de l'eau à la température de la salle

Le protocole de mesure est donné en partie expérimentale.

#### b- Mesure de l'indice de réfraction :

L'indice de réfraction 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.

L'appareil de mesure est le réfractomètre d'ABBE ou réfractomètre à incidence rasante représenté par la photo suivante.



Photos n° 14: Réfractomètre d' ABBE

Cliché: ANDRIAMIRIJA, 2007

La mesure de l'indice de réfraction est très importante car elle permet de vérifier la pureté d'une substance. Protocole de mesure : Cf partie expérimentale.

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 (t - t')$$

Où :

t: la température de référence (20°C)

t' : la température de la lecture lors de la détermination

### **III-4-1-3 Analyse par chromatographie en phase gazeuse :**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une *colonne*, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée *phase stationnaire*, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un *gaz porteur* (ou *gaz vecteur*). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

#### **a- Généralités sur l'appareil de CPG :**

Les appareils de chromatographie en phase gazeuse sont appelés chromatographes, et ils sont principalement composés:

- d'un four qui est équipé d'un système de refroidissement rapide;
- d'un système d'injection, qui va permettre d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser.
- d'une colonne (*capillaire ou remplie*), sur laquelle les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer suivant leurs affinités avec la phase stationnaire;
- d'un système de détection, qui va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier.

Un appareil chromatographique est constitué généralement de trois composantes :

- une phase fixe solide ou liquide qui a pour rôle de retenir les solutés,
- une phase mobile, liquide ou gazeuse qui va pousser les solutés et qui balaie continuellement la colonne,
- le produit à analyser qui est partagé entre les deux phases précédentes.

### b- Instrumentation :

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte trois parties : injecteur, colonne et détecteur à travers lesquelles un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer.

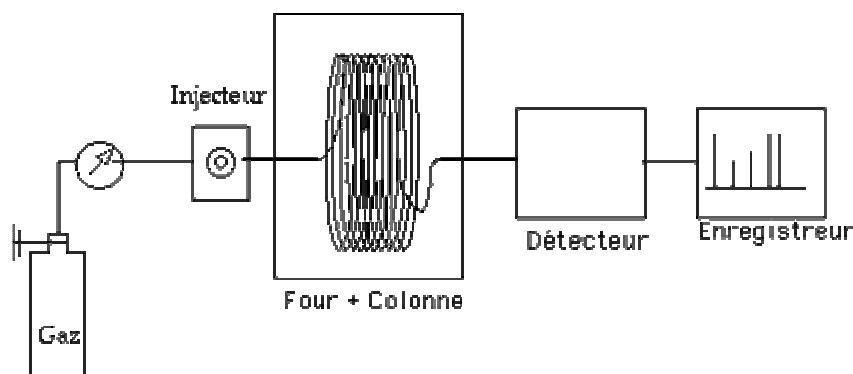


Figure n°15: Schéma d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse

Source : RENE, 2005

### c- Principe de fonctionnement

L'échantillon est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une microseringue. L'injecteur est traversé par le gaz porteur et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les quantités injectées peuvent varier de 0,2 à 5,0  $\mu\text{l}$ .

Ensuite, une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le *gaz porteur* (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se détacher les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire.

A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un organe essentiel qui est appelé *détecteur*. Le détecteur envoie un signal électronique vers un enregistreur (sorte d'imprimante) qui dessinera les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne). L'ensemble des pics est appelé *chromatogramme*.

### c-1 - L'injecteur:

Il sert à l'introduction du mélange à analyser dans la colonne.

Le système d'injection permet l'évaporation et le transfert dans la colonne des échantillons.

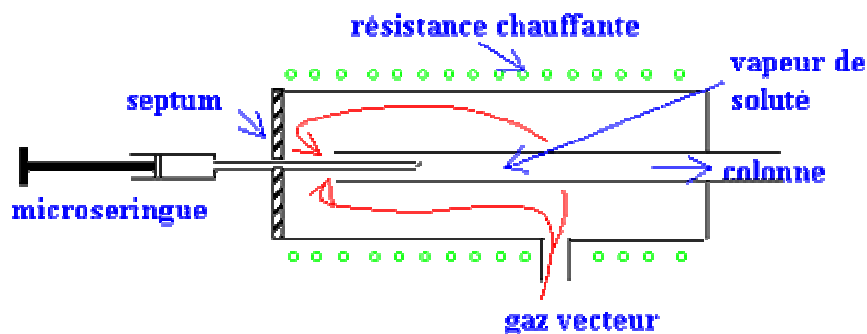


Figure n°16: Schéma d'un injecteur

Source : LEMEN ; 2006

### c-2 - Colonne:

Le succès de la séparation dépend du choix de la colonne chromatographique. La colonne la plus utilisée est la colonne capillaire qui est réalisée en déposant un film de phase stationnaire d'épaisseur environ  $1\mu\text{m}$  à l'intérieur d'un tube vide de diamètre 0,5 à 0,25 mm.

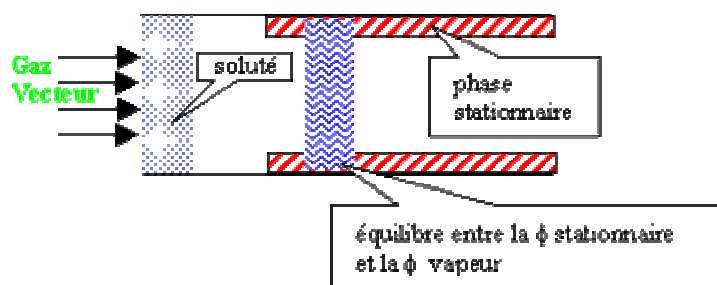


Figure n° 17 : Schéma d'une colonne capillaire

Source : LEMEN ; 2006

### c-3 - Le détecteur

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse utilisé est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

On enregistre la variation sur l'enregistreur en fonction du temps de sortie du pic, dit temps de rétention.

#### *c-4- Le gaz vecteur*

Le gaz vecteur disponible à partir de bouteilles sera chimiquement inerte (les plus utilisés N<sub>2</sub>, He, Ar) parfaitement épuré, et traversera la colonne à débit constant.

L'hydrogène (H<sub>2</sub>) est à conseiller pour l'utilisation de flux plus élevé sans perte d'efficacité (réduction du temps d'analyse).

#### d- Identification des pics

Le résultat d'analyse CPG est représenté par un chromatogramme constitué de plusieurs pics. Pour identifier les compositions chimiques d'huile essentielle, on utilise la technique de comparaison du temps de rétention. C'est à dire, on compare les temps de rétention des différents constituants, et on superpose le chromatogramme à identifier avec un chromatogramme type de la même huile essentielle dans les mêmes conditions. La co-injection peut être aussi effectuée.

Le test sensoriel complète l'identification des types chimiques des échantillons.

## **II-2 Analyse Spectroscopie Proche Infra Rouge sur les clones**

### **II-2-1. Historique**

La découverte de la région du proche infrarouge peut être attribuée à William Herschel pour son travail présenté en avril 1800 "Experiments on the Refrangibility of the invisible Rays of the sun". Mais il fallut attendre 1881 pour que les premiers spectres soient enregistrés.

Les domaines de longueur d'onde de rayonnement attribués au proche IR sont: 2500 - 830 nm (4000 à 12000 cm<sup>-1</sup>) ou 2500 - 640 nm (ou 4000 à 15 600 cm<sup>-1</sup>). La zone d'absorption dans le proche infrarouge est donnée en annexe n° 08.

### **II-2-2. Définition de la SPIR**

La spectroscopie proche infrarouge (SPIR) est une méthode d'analyse non destructive fondée sur l'absorption sélective de la lumière proche infrarouge par les composés chimiques de la matière organique. Elle se base sur la notion de liaison de covalence. Au sein de la molécule, ces liaisons constituent un système de vibration dont les fréquences varient selon la nature des atomes liés. L'absorption d'énergie provenant d'un rayonnement incident est conditionnée par la valeur de cette fréquence et donc par le type de liaison (C-H, O-H, N-H, C=O, etc.). La SPIR mesure alors la partie du rayonnement réfléchi par les vibreurs atomiques. Avec un modèle adéquat (calibration), une analyse qualitative et /ou quantitative est donc possible.

L'analyse qualitative permet ainsi d'identifier un produit par son empreinte spectrale quant à l'analyse quantitative, elle permet de prédire la teneur en constituants chimiques, ou encore la valeur de propriétés physiques associées à un échantillon...

### **II-2-3 Utilisation de la SPIR**

La spectroscopie proche infrarouge est de plus en plus utilisée dans plusieurs domaines où les analyses chimiques sont nécessaires :

- domaine alimentaire (contrôle de quantité, analyses chimiques, ...)
- agriculture (protéine, sucre,...)
- domaine pharmaceutique (contrôle de qualité des matières premières, des comprimés,...)
- industries chimiques (pétrole, polymères,...)
- industries de cellulose et de papier

Dans notre étude sur l'évolution des chémotypes (cas du recépage ou de la germination), cette méthode nous semble efficace pour déterminer l'appartenance des nouvelles feuilles aux classes chimiques déjà déterminées par cette méthode (Etude en cours de Madame ANDRIANOELISOA Hanitra) et par différents auteurs, car nos boutures ou plants sont loin de nous fournir 300g même 100g de feuilles (dans un laps de temps court qui nous a été accordé pour la présentation de notre mémoire de fin d'étude) afin de procéder à l'analyse classique des huiles obtenues par hydrodistillation.

### **II-2-4 Avantages et inconvénients de l'analyse NIRS (SPIR) :**



➤ **Avantages de l'analyse dans le proche infrarouge :**

La SPIR est une technique rapide pour des analyses qualitative et quantitative de matières organiques comparée à l'analyse chimique :

- **Pas de préparation de l'échantillon :** La spectroscopie proche infrarouge permet de mesurer directement un échantillon liquide, solide ou pâteux sans aucune préparation ni dilution.
- L'acquisition des spectres est non destructive
- **Pas de résidus :** Cette méthode est idéale quand l'échantillon est mesuré directement. Ainsi, l'utilisation de solvants toxiques ou de consommables pour sa préparation n'est pas nécessaire. C'est à dire la méthodologie est écologique (pas de produits chimiques)
- **Des mesures rapides :** Les spectromètres proches IR peuvent analyser un échantillon et donner un résultat en quelques secondes.
- **Pas de problème avec les flacons en verre :** Le verre est un matériau transparent dans le proche IR. Les échantillons peuvent donc être mesurés au travers de leur contenant, et les liquides sont facilement analysés au sein de flacons en verre peu onéreux et jetables.
- **Des analyses faciles et précises :** Les analyses proche IR ne nécessitant pas de préparation d'échantillon, l'erreur liée à l'échantillonnage est considérablement réduite, ce qui augmente ainsi la précision et la reproductibilité des mesures.
- **Coût de l'analyse :** En comparaison avec les analyses chimiques classiques, le coût le plus élevé pour le proche IR est celui de la mise en place initiale de la méthode d'analyse ; puis, plus le nombre d'échantillons augmente, plus le coût d'une analyse décroît. C'est à dire l'analyse est moins chère après l'investissement des appareils
- Possibilités d'analyse de produits toxiques ou dangereux à distance (plus de 100 m en utilisant les fibres optiques).

➤ **Inconvénients de l'analyse dans le proche infrarouge :**

### L'approche SPIR

- est basée sur des valeurs de référence (réduit la quantité d'analyse)
- demande des procédés mathématiques et un rigoureux contrôle étape par étape (échantillons, à partir des échantillons, contrôle de valeur de référence pour l'analyse spectrale)
- nécessite la formation d'un technologue
- Manque de corrélation structurale (difficultés pour l'interprétation des spectres).
- La taille des particules ainsi que l'orientation modifient les spectres (même problème qu'en IR moyen).
- Manque de bibliothèques de spectres diversifiés.

### **II-2-5 Instrumentation de la SPIR**

Les appareils NIRS sont équipés de filtres capables d'utiliser de longueurs d'onde optimales pour chaque constituant. Ils sont utilisés pour des analyses de routine et sont aussi précis que les méthodes chimiques, toutefois ce sont des instruments pré calibrés.



Photos n° 15: Appareil de la spectroscopie proche infra rouge

Source : ANDRIANOELISOA, 2007

### **II-2-6 Principe général des appareils NIRS**

La simplicité et la rapidité de la méthode d'analyse s'opposent à la lourdeur de l'analyse chimiométrique des résultats obtenus, le progrès de l'électronique, de l'informatique et de la statistique a permis le développement de cette méthode si bien que cette dernière

trouve un grand nombre d'applications dans le domaine industriel (chimie, pharmacie, polymères, agroalimentaire, alimentation animale, etc.).

La spectroscopie proche IR est basée sur l'absorption de radiations lumineuses par la matière. Le principe de fonctionnement général des appareils peut être décomposé comme suit :

- ◆ Faisceau lumineux issu d'une source proche IR envoyé sur un disperser, qui fournit le spectre de cette lumière.
- ◆ Après traversée du disperser, irradiation de l'échantillon à analyser.
- ◆ 2 modes possibles : réflexion ou transmission suivant que le faisceau incident se réfléchit ou traverse l'échantillon.
- ◆ Réception du faisceau réfléchi ou transmis sur des capteurs, conversion en signal : le spectre NIRS est alors obtenu.

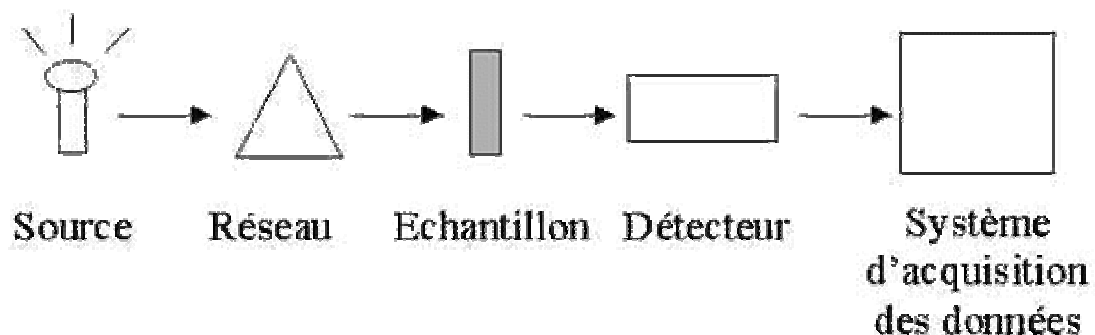


Figure. 18: Principe de la spectroscopie à transmission.

Source : WIELY ; 2001

Le principe général de la NIRS est comme suit:

- ✓ la source de lumière proche IR envoie un faisceau qui pénètre dans l'interféromètre où le " codage spectral " a lieu (les franges créées par les phénomènes d'interférences sont suffisamment fines pour permettre une séparation spatiale de longueur d'onde, comme le fait un réseau).

- ✓ Le faisceau lumineux sortant de l'interféromètre se réfléchit ou traverse l'échantillon à analyser qui absorbe des fréquences énergétiques spécifiques.
- ✓ Le faisceau réfléchi ou transmis arrive sur le détecteur proche IR.
- ✓ Le signal mesuré par le détecteur au cours du temps est traduit sous forme d'un interférogramme (intensité lumineuse en fonction de la différence de trajet optique des deux faisceaux à l'intérieur de l'interféromètre). Celui-ci est digitalisé et envoyé vers un ordinateur. Le spectre proche IR correspondant est ainsi obtenu (intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde).

#### a- Source lumineuse proche IR

Photomètres à filtres, Spectrophotomètres à réseau, Spectromètre à diodes électroluminescentes sont des appareils sources lumineuses mais les plus utilisés sont des lampes. Les lampes les plus utilisées sont en quartz - tungstène - halogène (QTH) (gamme spectrale : 250 - 2500 nm, soit 40000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### b- Optique

Les appareils classiques dispersifs (à prisme ou réseau), utilisent des lentilles focalisantes et des fentes.

#### c- Détection

En NIRS classique (avec un prisme ou un réseau) : utilisation d'un monochromateur à balayage et d'un détecteur composé d'un élément simple placé sur la fente de sortie. Un spectre complet est alors acquis point par point en déplaçant le foyer pour sélectionner chaque longueur d'onde.

### **II-2-7 La Chimiométrie ou analyse de données IR**

La chimiométrie se repose sur la mise en lien d'une matrice (ligne = échantillons et colonne = absorbance de la matière pour des longueurs d'onde données) avec une mesure de référence et la réduction du nombre de dimensions (de variables = longueur d'ondes) et construction de modèles prédictifs (équation de calibration).

Elle s'effectue en 4 étapes : Mesure de référence - Calibration sur échantillons représentatifs - Validation sur échantillons indépendants - Prédiction sur nouveaux échantillons.

Les méthodes utilisées pour évaluer les propriétés chimiques des échantillons sont basées sur les relations entre absorbance dans le proche infrarouge et la composition chimique (physique). L'absorbance s'effectue entre 700-2200 nm (nanomètre)

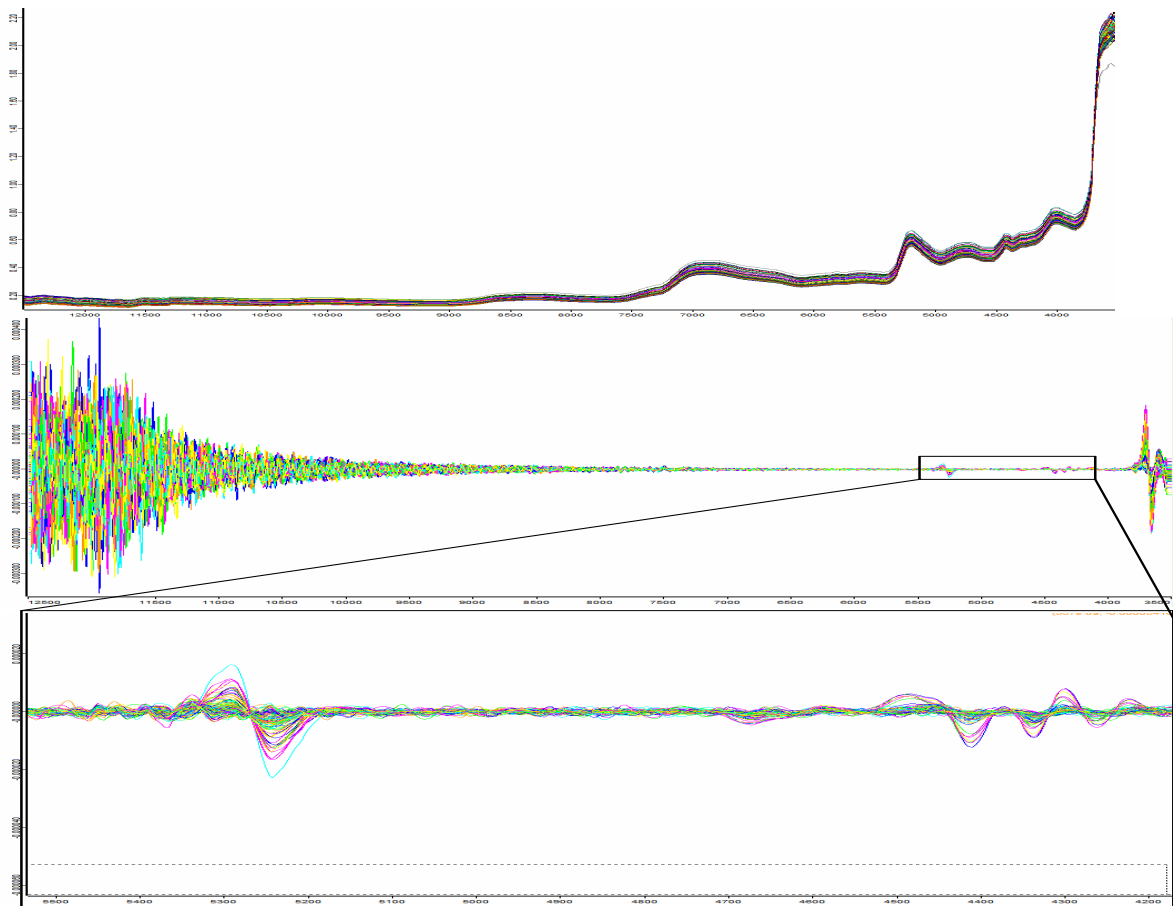


Figure n° 19: Représentation spectrale des résultats de l'analyse NIRS

Source : ANDRIANOELISOA, 2007

### **II-3 Méthodes d'analyses statistiques**

L'analyse statistique a pour principal outil des données numériques et graphiques. Elle a pour objectif de ressortir les structures pertinentes des grands ensembles de données.

Le traitement des tableaux de données quantitatives a fait recours aux outils statistiques donnés par le logiciel XLSTAT 2007.5 qui sont l'analyse en composantes

principales (ACP), classification hiérarchique ascendante (CHA) et l'analyse factorielle discriminante (AFD).

### **II-3-1 Analyse en composantes principales (ACP)**

✘ **Définition :** C'est une Technique d'analyse statistique, portant sur au moins deux variables numériques, permettant une représentation graphique des liens entre variables numériques et des positions des individus par rapport aux vecteurs de ces variables.

✘ **Objectif de la méthode :** Déterminer les axes factoriels (composantes principales) sur lesquels sont projetés les individus. Donc, décrire les données contenues dans un tableau d'individus et de caractères. Ce tableau s'appelle matrice des données. Il se compose :

- de lignes d'individus : des personnes, des entreprises, des journaux, etc.,
- de colonnes de variables : quantitatives (age, taille, nombre d'employés, etc.).

L'ACP permet alors de réduire  $n$  facteur en  $k$  facteur ( $k < n$ ) c'est à dire réduire l'essentiel de l'information des données et de fournir une représentation imagée des individus par rapport aux variables.

Afin de visualiser les groupes obtenus par l'ACP, nous avons procédé à la classification hiérarchique ascendante.

### **II-3-2 Classification hiérarchique ascendante (CHA)**

✘ **Définition :** C'est une méthode d'agrégation de Ward à distance euclidienne. La CAH est une méthode de classification permettant une construction de hiérarchies indicées. On parle de classification hiérarchique, car chaque classe d'une partition est incluse dans une classe de la partition suivante. Elle a pour but de visionner les individus, les observations en ACP.

✘ **Objectif de la méthode :** Classer des individus ayant un comportement similaire sur un ensemble de variables. L'objectif de la méthode de classification hiérarchique est donc de rechercher à chaque étape les deux classes les plus proches, on les fusionne, on continue jusqu'à qu'il n'y ait qu'une classe. On regroupe les individus les plus proches et ainsi de suite de proche en proche. Les tableaux de données se présente sous forme de matrice de proximité (distance euclidienne). Afin de confirmer les résultats de l'ACP, on

fait l'analyse factorielle discriminante. C'est à dire on vérifie si les classes obtenues par CHA sont reproduites en AFD.

### **II-3-3 Analyse factorielle discriminante (AFD)**

✘ **Définition :** C'est une méthode de comparaison de G groupe à l'aide de plusieurs variables. L'AFD est aussi une technique d'analyse de données assez semblable à l'ACP (bien que plus complexe). Donc, comme en Analyse en Composantes Principales, chaque paire d'axes définira un plan factoriel sur lequel les classes seront projetées : un examen visuel permettra alors d'étudier leurs formes et leurs positions relatives.

Son but est d'améliorer la présentation de l'image et de confirmer les résultats de l'ACP. C'est à dire elle résout le problème d'affectation des individus par des vecteurs de description en arrangeant le classement des individus les plus homogènes dans un échantillon.

✘ **Objectif :** Identifier des directions sur lesquelles les projections des classes sont particulièrement bien séparées. Ces directions, dites "Axes factoriels discriminants", sont obtenues comme combinaisons linéaires des variables originales. Donc, l'Analyse Factorielle Discriminante a pour objectif l'identification d'axes factoriels tels que les projections des classes sur les sous-espaces définis par ces axes soient aussi bien séparées que possible.

La discrimination sera d'autant plus efficace que les projections des nuages des points représentant chaque groupe seront peu dispersées d'une part, et éloignées les unes des autres d'autres part. La discrimination par AFD pourra alors justifier et éventuellement corriger, le classement prédéfini en obtenant une séparation optimale des groupes.

### **CONCLUSION PARTIELLE**

Pour atteindre l'objectif de ce mémoire, la méthodologie de travail consiste d'abord à multiplier végétativement *Ravensara aromatica* Sonnerat.

Le bouturage est une technique nécessaire pour la conservation des ressources génétiques et pour la reproduction. Les descentes sur terrain ont concrétisé l'étape de l'échantillonnage des rameaux pour le bouturage et des feuilles de rejet et de régénération pour la distillation.

Les distillations d'huile essentielle sont faites au laboratoire FOFIFA/DRFP en utilisant une rampe de cinq appareils d'hydro distillation. Les mesures de la densité, de l'indice de réfraction ont été effectuées pour caractériser les huiles essentielles recueillies. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse est obligatoire pour déterminer qualitativement et quantitativement les compositions chimiques de ces essences. Les nouvelles feuilles de boutures sont assez petites pour une extraction, l'analyse en spectroscopie infrarouge est réalisées sur ces jeunes feuilles pour pouvoir atteindre l'objectif de l'étude : il s'agit d'une étude de l'interaction de la lumière avec la matière.

Les résultats de cette étude sont présentés et discutés dans la dernière partie.



# **3<sup>ème</sup> partie : RESULTATS ET DISCUSSION**

### **3<sup>ème</sup> partie : RESULTATS ET DISCUSSION**

Cette partie va présenter les résultats globaux des travaux effectués ainsi que les interprétations y afférentes. Les résultats des bouturages puis les résultats d'analyse physico-chimiques des huiles essentielles et, en dernier lieu, l'évolution des chémotypes des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* selon le traitement sylvicole seront mis en évidence.

#### **I- RESULTATS DU BOUTURAGE:**

Les rameaux de boutures sont collectés dans quatre sites : *Ampasina*, *Didy*, *Raboana*, *Anosibeana'ala*.

L'évolution des boutures telle que, la formation des bourgeons, la croissance des nouvelles feuilles, l'allongement des boutures, la mort des boutures..., varie jour par jour.

L'observation des boutures se fait chaque semaine. Une fiche d'observation de bouturage est donnée en annexe n° 09.

Exemple de résultats d'observation est donné dans le tableau n°09.

Tableau n° 09: Résultats d'observation des boutures de *Ravensara aromatica*

Code arbre	Chémotype/ type chimique	Localisation	Date de Récolte	Date de mise en terre/ et nombre boutures au départ	Nombre boutures vivantes après 05 mois (pour 08/03/07) ou 03 mois (pour 13/05/07) et taux de survie %	Nombre boutures vivantes après 08 mois (pour 08/03/07) ou 05 mois (pour 13/05/07) et taux de survie %	Observation
A23 A25 DE17 DH27	Chém. 2 Chém. 2 Chém. 3 Chém. 1	Ampasina Ampasina Didy Didy	08/03/07 08/03/07 13/05/07 13/05/07	08/03/07 - 238 09/03/07 - 238 15/05/07 - 30 15/05/07 - 140	38 - 16% 78 - 33% 55 - 73% 2-1%	36 - 15% 77 - 33% 39 - 93% 0 - 0%	6 individus avec des nouvelles feuilles 5 individus avec des nouvelles feuilles 5 individus avec des bourgeons
A26 A29 A1	Chém. 2 Chém. 4 Chém. 2	Ampasina Ampasina Raboana	08/03/07 08/03/07 10/06/07	09/03/07 - 238 08/03/07 - 238 10/06/07 - 274	33 - 14% 14 - 6% 112 - 41%	31 - 13% 5 - 2% 71 - 26%	5 individus avec des nouvelles feuilles  1 individu avec des nouvelles feuilles et 1 individu avec des bourgeons
A27 A30	Chém. 3 Chém. 4	Ampasina Ampasina	08/03/07 08/03/07	09/03/07 - 238 09/03/07 - 238	21 - 9% 11 - 5%	09 - 4% 03 - 1%	1 individu avec des bourgeons
DB1 DJ28 DC11	Chém. 2 Chém. 2 Chém. 1	Didy Didy Didy	13/05/07 13/05/07 13/05/07	15/05/07 - 84 15/05/07 - 84 15/05/07 - 70	7 - 8% 0 - 0% 0-0%	0 - 0% 0 - 0% 0 - 0%	
DG24 DJ34	Chém. 3 Chém. 1	Didy Didy	13/05/07 13/05/07	15/05/07 - 104 15/05/07 - 52	3 - 3% 0 - 0%	0 - 0% 0 - 0%	
NT1	Chém. 4	Anosibeana'ala	09/06/07	11/06/07 - 238	91 - 38%	91 - 38%	9 individus avec des nouvelles feuilles et 2 individus avec des bourgeons
NB1 NR3	Chém. 4 Chém. 5	Anosibeana'ala Anosibeana'ala	09/06/07 09/06/07	11/06/07 - 135 11/06/07 - 135	22 - 16% 78 - 58%	0 - 0% 57 - 42%	3 individus avec des nouvelles feuilles et 1 individu avec des bourgeons
J4 W3	Chém. 1 Chém. 5	Raboana Raboana	08/03/07 08/03/07	12/06/07 - 288 12/06/07 - 180	283 - 98% 101 - 56%	55 - 19% 70 - 39%	2 individus avec des nouvelles feuilles 4 individus avec des nouvelles feuilles et 1 individu avec des bourgeons
J3 B3	Chém. 1 Chém. 1	Raboana Raboana	08/03/07 08/03/07	12/06/07 - 238 12/06/07 - 238	62 - 26% 131 - 55%	33 - 14% 88 - 37%	1 individu avec des bourgeons 3 individus avec des nouvelles feuilles et 1 individu avec des bourgeons

Chém : chémotype

En résumé, 569 boutures poussent dont :

- 518 individus sont en état statique (pas de bourgeon ni de nouvelles feuilles ni d'élongation) mais restent verts.
- 39 boutures ont des nouvelles feuilles
- 12 boutures ont des bourgeons.

Plusieurs facteurs ont pu affecter la réussite du bouturage. Ainsi, on note que les boutures mortes sont dues :

- ✓ à un excès d'eau, qui a stagné à la surface du substrat et ceci a provoqué la pourriture des boutures.
- ✓ à un retard de la mise en place de l'ombrière lors des premières expérimentations
- ✓ les rameaux trouvés au moment de la récolte sont très jeunes car presque dans tous les sites de récoltes, on n'a que très peu des rameaux moyens ou ligneux
- ✓ à une utilisation de benlate hors dose lors du traitement de la gale des boutures (venant de Didy)
- ✓ à un défaut de matériel (pas de pulvérisateur), l'arrosage se fait à l'arrosoir. Des grosses gouttes d'eau entraînent les mousses vertes à la surface des containers plastiques et la mort des boutures.
- ✓ A l'utilisation de fertilisant non traité « fumier » qui aurait entraîné des champignons à la surface des terres.

Comme l'objectif de l'étude est de vérifier les chémotypes par divers traitements sylvicoles, les nouvelles feuilles des boutures ne sont ni assez développées ni suffisantes pour être distillées, nous projetons de les analyser par la méthode NIRS.

## **II- RESULTATS D'ANALYSE AU LABORATOIRE**

### **II-1 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

23 échantillons des feuilles de *Ravensara aromatica* provenant de deux sites (Betanimainty, Morarano) sont distillés au laboratoire du DRFP- FOFIFA à Ambatobe. La quantité des huiles obtenues dépend d'une part de la quantité des feuilles distillées et d'autre part de l'état de maturité des feuilles des rejets ou des régénérations avec lesquelles la collecte des feuilles a été effectuée.

Après extraction, on constate que plus la quantité des feuilles à distiller est faible, plus l'huile obtenue est en faible quantité. De même, plus les rejets ou les régénérations sont récentes plus la quantité d'huile est faible.

### II-1-1 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

La plupart des huiles essentielles extraites ont présenté un aspect liquide mobile trouble après l'extraction. La couleur varie du jaune clair à jaune trouble. L'odeur est fonction du type chimique de l'huile. Certains échantillons présentent une odeur d'anis prononcée alors que d'autres manifestent une odeur florale ou forte (épicée).

### II-1-2 Caractéristiques physico-chimiques

Outre la mesure de l'humidité des feuilles, la mesure de la densité relative, la détermination de l'indice de réfraction, et le calcul du rendement d'extraction ont été effectués sur certains échantillons.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau suivant.

**Tableau n° 10: Caractéristiques physico-chimiques de quelques échantillons d'huiles**

Code	Humidité (%)	Pi (g)	Vf (ml)	Pf (g)	Rdt (%v/p)	Rdt (%p/p)	Densité	IR $n_D^{20}$
BeR1	44,28	20	Trace	Trace	-	-	-	1,5023
BeR2	43,01	30	Trace	Trace	-	-	-	1,5102
BeR3	42,23	446	4,8168	4,5046	1,08	1,01	-	1,4978
BeR4	42,59	44	1,3	1,1132	2,95	2,53	-	1,4909
BeX	45,99	81	1	0,9558	1,23	1,18	-	1,5128
AXrj2	49,02	66	1,6	1,4916	2,42	2,26	-	1,5133
AXrj3	49,65	348	1,2	0,4176	0,34	0,12	-	1,4842
Axrj5	49,48	340	1,9	1,1560	0,55	0,34	-	1,5192
BMXrj3	51,02	300	1,8	1,7100	0,60	0,57	-	1,4733
AXrj1	49,79	44	0,9	0,8844	2,04	2,01	-	-
BSXrg1	50,23	78	1	0,9438	1,28	1,21	-	1,4803
MA40	69,30	400	8	7,6000	2	1,90	0,9640	-
BSXrj2	50,44	67	2,2	2,1641	3,28	3,23	0,9793	1,4816
MA41	67,78	402	8,5	8,4822	2,11	2,03	0,9843	-
Mrg	71,03	460	5,8	5,3360	1,26	1,16	0,9889	1,5189
AXrj4	49,36	191	4,7	4,2975	2,46	2,25	0,8895	1,5189
Mrj1	59,38	341	5,9	5,8652	1,73	1,72	-	1,5196
BMXrj2	47,06	167	5	4,6426	2,99	2,78	-	1,4161

<b>BMXrj1</b>	49,72	345	4 ,8	4,2780	1,39	1,24	1,0126	1,5161
<b>BMXrg1</b>	49,35	112	5,5	5,4096	4,91	4,83	0,9549	-
<b>BSXrj1</b>	50,01	378	5,5	4,9896	1,45	1,32	1,0031	1,5203
<b>Mrj2</b>	58,01	360	8	7,668	2,22	2,13	0,9549	-
<b>BMXrg2</b>	51,65	69	2	1,9389	2,89	2,81	1,0945	1,5242

**Pi** : Poids initial

**Vf** : Volume final

**Pf** : Poids final

**IR** : Indice de réfraction

**Rdt** : Rendement

Certains échantillons présentent une très faible quantité d'huile pour permettre la mesure de la densité et de l'indice de réfraction. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas pu déterminer les caractéristiques physico-chimiques de certains échantillons.

Les listes des feuilles et huiles pour l'analyse CPG, NIRS sont données en annexe n°10 ; 11.

Comme le but de l'étude est de voir l'évolution des chémotypes d'huile essentielle par traitement sylvicole, la comparaison des caractéristiques physico-chimiques de référence avec les rejets et les régénérations s'avère aussi intéressante.

**Tableau n° 11: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles des feuilles des pieds mères (RAZAFINIMANANA ; 2001) avec ceux des rejets de Betanimainty**

	<b>Pieds mère (RAZAFINIMANANA; 2001)</b>	<b>BeR1</b>	<b>BeR2</b>	<b>BeR3</b>	<b>BeR4</b>	<b>BeX</b>
<b>Rendement</b> <b>% (p/p)</b>	0,8643 à 0,8817	-	-	1,01	2,53	1,18
<b>Indice de réfraction</b> $n_D^{20}$	1,4786 à 1,4855	1,5023	1,5102	1,4978	1,4909	1,5128

Le tableau n°11 montre que l'indice de réfraction de l'huile essentielle de feuille de rejet se situe entre 1,4909 – 1,5128.

L'indice de réfraction de l'arbre mère se situe à 1,4786 – 1,4855 (**RAZAFINIMANANA ; 2001**).

Une légère différence de l'indice de réfraction est observée entre les huiles extraites des feuilles de pied-mère et celles du rejet.

L'indice de réfraction de feuilles de Havozo de plante-mère est légèrement inférieur à celui des rejets. Donc, on peut dire que les huiles essentielles sont pures.

Quant au rendement, pour les rejets de Betanimainty, il varie de 1,01 à 2,53% et 0,40 à 0,68% pour les plantes mères, montrant ainsi que la teneur en huile essentielle des feuilles des pieds souches est inférieure à celle des rejets.

**Tableau n° 12: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles des arbres mères (RAOBELISON ; 2001) avec les rejets collectés dans la forêt d'Amparihibe**

	Référence (RAOBELISON; 2001)	AXrj1	AXrj2	AXrj3	AXrj4	AXrj5
<b>Rendement % (p/p)</b>	0,05 à 0,07	2,01	2,26	0,12	2,25	0,34
<b>Densité (<math>d_{20}^{20}</math>)</b>	0,8926	-	-	-	0,8895	-
<b>Indice de réfraction (<math>n_D^{20}</math>)</b>	1,4848 à 1,4895	-	1,5133	1,4842	1,5189	1,5192

On peut dire que le rejet n°3 dans la forêt d'Amparihibe présente des valeurs de rendement et d'indice de réfraction inférieur à celles des rejets n°2 ; 4 et 5.

La densité d'huile essentielle de la plante mère d'Amparihibe est supérieure à celle du rejet. Tandis que pour l'indice de réfraction, la plante souche à une valeur inférieure à celle du rejet ; sauf pour le cas du rejet n°3, l'indice de réfraction du plante mère a une valeur plus élevée par rapport à ceux rejet n° 3. D'où une hétérogénéité de l'indice de réfraction entre la plante-mère et les rejets.

**Tableau n° 13: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles des feuilles des arbres mères (RAOBELISON ; 2001) avec celles des rejets et de régénération dans la forêt de Besakay**

	Référence (RAOBELISON ; 2001)	BSXrj1	BSXrj2	BSXrg1
<b>Rendement % (p/p)</b>	0,05 à 0,07	1,32	3,23	1,21
<b>Densité (<math>d_{20}^{20}</math>)</b>	0,8999	1,0031	0,9793	-
<b>Indice de réfraction (<math>n_D^{20}</math>)</b>	1,4841	1,5203	1,4816	1,4803

La densité de la référence est inférieure à la densité des rejets du site de Besakay.

L'indice de réfraction peut être inférieur (cas du rejet 1) ou supérieur (rejet 2 et regeneration1) à la référence.

Quant au rendement, la valeur de la référence est inférieure à celles des rejets ou des régénérations.

**Tableau n° 14: Comparaison des caractéristiques physico-chimiques d'huile essentielle des feuilles de plante souche (RAOBELISON ; 2001) avec celles des rejets et des régénérations dans la forêt de Bemanja**

	Référence (RAOBELISON ; 2001)	BMXrj1	BMXrj2	BMXrj3	BMXrg1	BMXrg2
<b>Rendement % (p/p)</b>	0,12 – 1,16	1,24	2,78	0,57	4,83	2,81
<b>Densité (<math>d_{20}^{20}</math>)</b>	1,0099 -1,0143	1,0126	-	-	0,9549	1,0945
<b>Indice de réfraction (<math>n_D^{20}</math>)</b>	1,5221 – 1,5247	1,5161	1,4161	1,4733	-	1,5242

D'après le tableau n°14, les valeurs de la densité, d'indice de réfraction, de rendement de l'huile de régénération sont assez élevées par rapport à celles des rejets.

La densité de la référence est à peu près égale ou supérieure à celle des rejets ou des régénérations.



Pour les rejets, l'indice de réfraction est inférieur à celui de la référence tandis que pour la régénération, c'est à peu près la même.

Quant au rendement, la valeur de la plante souche est dans la majorité des cas (4 sur 5) inférieure à celle du rejet et de la régénération (0,57 à 4,83 % (p/p)).

**Tableau n° 15: Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* suivant les types chimiques**

Type chimique		Methyl chavicol			Methyl eugenol			Monoterpene		
		Pied-mère	Rejet	Régénération	Pied-mère	Rejet	Régénération	Pied-mère	Rejet	Régénération
M I N	Rdt	-	1,72	-	0,05	1,01	2,81	0,05	0,12	1,21
	Dnst	-	-	-	0,8999	0,8895	0,9549	0,8926	0,9549	-
	I. réf	-	-	-	1,4841	1,4909	1,5242	1,4848	1,4816	1,4803
M A X	Rdt	-	2,22	-	0,07	2,78	4,83	0,07	3,23	-
	Dnst	-	0,9549	-	-	1,0031	1,1945	1,4895	0,9793	-
	I. réf	-	1,5196	-	-	1,5242	-	-	1,5192	-

**Rdt** : rendement

**MIN** : minimum

**Dnst** : densité

**MAX** : maximum

**I. réf** : indice de réfraction

## **II-2 Résultats du test olfactif**

Les résultats généraux du test olfactif sont donnés en annexe n° 12. Le test est effectué par six individus pour classer les échantillons.

**Tableau n° 16: Classement des feuilles par le test olfactif**

Nombre d'individus ayant senti l'anis	Nombre d'échantillons	Code des échantillons
6	3	168 ; 171 ; 174
5	4	162 ; 166 ; 167 ; 180
4	4	151 ; 157 ; 165 ; 170
3	3	159 ; 169 ; 175
2	5	152 ; 155 ; 160 ; 173 ; 177
1	7	153 ; 161 ; 172 ; 176 ; 178 ; 181 ; 182
0	6	154 ; 156 ; 163 ; 164 ; 158 ; 179
Total	32	

L'odeur d'anis est facile à détecter avec les feuilles comme avec les huiles.

L'examen des résultats du tableau n°16 a permis de classer les échantillons des feuilles en deux groupes, l'un sentant l'anis, l'autre n'ayant aucune odeur d'anis.

**Tableau n° 17: Classement des feuilles en deux groupes**

	Nombre des feuilles	Code des échantillons
Groupe 1	26	168 ;171 ;174 ;162 ;166 ;167 ;180 ;151 ;157 ;165 ;170 ;159 ;169 ;175 ;152 ;155 ;160 ;173 ;177 ;153 ;161 ;172 ;176 ;178 ;181 ;182
Groupe2	6	154 ; 156 ; 163 ; 164 ; 158 ; 179
<b>Total</b>	32	

Le groupe 1 regroupe tous les échantillons qui sentent, même très faiblement, l'anis c'est à dire le méthyl chavicol. Tandis que le groupe 2 comprend les échantillons où l'odeur d'anis est totalement absente c'est à dire tous les échantillons qui ne contiennent pas du méthyl chavicol assez significatif dans leur composition.

Certains échantillons de feuilles sont extraits par hydrodistillation et les huiles obtenues sont aussi classées par les mêmes individus. Ceci a pour but de grouper les chémotypes des huiles testées olfactivement et de vérifier ces résultats à partir de ceux obtenus par l'analyse chromatographique.

**Tableau n° 18 : Classement des huiles essentielles par le test olfactif**

Nombre d'individu ayant senti l'anis	Nombre d'échantillons	Code des échantillons
6	1	167
5	2	168 ; 183
4	1	171
3	4	166 ; 169 ; 175 ; 180
2	1	178
1	2	162 ; 163
0	12	161 ; 164 ; 165 ; 170 ; 172 ; 173 ; 174 ; 176 ; 177 ; 179 ; 181 ;182
<b>Total</b>	23	

Etant donné le nombre élevé d'échantillons douteux, un deuxième test a été fait pour mieux les classer. Deux sujets ont effectué ce test et ont classé les huiles en deux groupes et après en cinq chémotypes.

**Tableau n° 19 : Classement des huiles essentielles en deux groupes**

	Nombre des huiles	Code des échantillons
Groupe 1	07	162 ; 166 ; 167 ; 168 ; 171 ; 180 ; 183
Groupe 2	16	161 ; 163 ; 164 ; 165 ; 169 ; 170 ; 172 ; 173 ; 174 ; 175 ; 176 ; 177 ; 178 ; 179 ; 181 ; 182
<b>Total</b>	23	

**Groupe 1** : Huile avec odeur d'anis

**Groupe 2** : Huile sans odeur d'anis

Pour bien préciser les chémotypes de ces huiles, deux testeurs ont confirmé les classes des huiles par odeur selon les cinq références (un échantillon à Méthyl chavicol ( > 90%) ou Chém 1, un échantillon à Méthyl eugénol (>80%) ou Chém 2, un échantillon à  $\alpha$ -terpinène et limonène respectivement 27,4% et 16% ou Chém 3, un échantillon à forte teneur de sabinène 48% ou Chém 4 et enfin un échantillon à forte teneur en limonène (environ 53%) ou Chém 5).

Cinq classes (chémotypes) des huiles sont données dans le tableau n°19.

## *Tableau n° 20 : Caractéristiques des odeurs des huiles essentielles*

Numéros	Code	Odeur des échantillons	Chémotype
161	Be X	Epicées, Terpénique, forte	Chém. 3
162	Be R1	Anisée	Chém. 1
163	BeR2	Chaude, amer	Chém. 2
164	BeR3	Chaude, amer	Chém. 2
165	BeR4	Chaude, amer	Chém. 2
166	MA40	Anisée	Chém. 1
167	MA41	Anisée	Chém. 1
168	Mrj2	Anisée	Chém. 1
169	BMXrj3	Florale, fraîche, épicée	Chém. 4
170	BMXrg2	Chaude, amer	Chém. 2
171	Mrj1	Anisée	Chém. 1

172	BSXrj2	Chaude, amer	Chém. 2
173	BMXrj2	Chaude, amer	Chém. 2
174	BSXrj1	Chaude, amer	Chém. 2
175	BMXrj1	Chaude, amer	Chém. 2
176	AXrj4	Chaude, amer	Chém. 2
177	BMXrg1	Chaude, amer	Chém. 2
178	Axrj3	Fruité citron- orange- épicée	Chém. 5
179	Axrj1	Chaude, amer	Chém. 2
180	Axrj2	Anisée	Chém. 1
181	Axrj5	Fruité citron- orange- épicée	Chém. 5
182	BSXrg1	Epicées, Terpénique, forte	Chém. 3
183	Mrg	Anisée	Chém. 1

Pour vérifier ces résultats, six sujets ont effectué le même test et ont classé les échantillons en cinq chémotypes. C'est à dire, le groupe 2 (odeur sans anis) constitue cinq sous groupes. Les cinq sous groupes correspondent à cinq chémotypes différents.

**Tableau n° 21 : Classement des huiles essentielles par les six autres sujets**

Numéros	Code	Sujet 1	Sujet 2	Sujet 3	Sujet 4	Sujet 5	Sujet 6
161	Be X	Ss gpe3	-	Ss gpe 3	Ss gpe 3	Ss gpe 3	Ss gpe 3
162	Be R1	Ss gpe 1	Ss gpe1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1
163	BeR2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2
164	BeR3	Ss gpe 2	Ss gpe2	Ss gpe 2	-	Ss gpe 3	Ss gpe 2
165	BeR4	Ss gpe 2	Ss gpe 4	Ss gpe 4	Ss gpe 4	Ss gpe 4	Ss gpe 4
166	MA40	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1
167	MA41	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1
168	Mrj2	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1
169	BMXrj3	Ss gpe 4	Ss gpe 3	Ss gpe 4	Ss gpe 4	Ss gpe 4	Ss gpe 4
170	BMXrg2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2
171	Mrj1	Ss gpe 1	Ss gpe1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1
172	BSXrj2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2

173	BMXrj2	-	Ss gpe 2	-	Ss gpe 2	Ss gpe 2	-
174	BSXrj1	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 1
175	BMXrj1	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2
176	Axrj4	Ss gpe 2	Ss gpe 4	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2
177	BMXrg1	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2
178	Axrj3	Ss gpe 2	Ss gpe 5	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 5	Ss gpe 5
179	Axrj1	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2	Ss gpe 2
180	Axrj2	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1
181	Axrj5	Ss gpe 5	Ss gpe 5	Ss gpe 5	Ss gpe 5	Ss gpe 5	Ss gpe 5
182	BSXrg1	Ss gpe 3	Ss gpe 3	Ss gpe 3	Ss gpe 3	Ss gpe 3	Ss gpe 3
183	Mrg	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1	Ss gpe 1

Ss gpe : sous groupe

D'après les six sujets, les résultats de classement des huiles sont similaires à ceux trouvés par les deux premiers testeurs sauf pour le cas des échantillons numéro 164 (Be R3), 178 (Axrj3), 181 (Axrj5) où l'odeur d'épice est prononcée. C'est peut être la raison pour laquelle certains sujets ne sentent pas la même odeur de la référence. La concentration des huiles, l'odeur des différents composés, l'odeur chaude, la faible quantité d'échantillon sont aussi des raisons pour laquelle les sujets ne sentent pas la même odeur du témoin.

**Tableau n° 22 : Récapitulation des classes des huiles**

Chémotype	Nombre	Numéros	Code
Chém 1	07	162 ; 166 ; 167 ; 168 ; 171 ; 180 ; 183	BeR1 ; MA40; MA41; Mrj2; Mrj1; Axrj2; Mrg
Chém 2	11	163 ; 164 ; 165 ; 170 ; 172 ; 173 ; 174 ; 175 ; 176 ; 177 ; 179	BeR2 ; BeR3 ; BeR4 ; BMXrg2 ; BSXrj2 ; BMXrj2 ; BSXrj1 ; BMXrj1 ; Axrj4 ; BMXrg1 ; Axrj1
Chém 3	2	161 ; 182	BeX; BSXrg1
Chém 4	1	169	BMXrj3
Chém 5	2	178; 181	AXrj3; AXrj5
Totale	23		

Après le test olfactif, les huiles essentielles de *Ravensara aromatica* extraites à partir des échantillons des régénérations et des rejets sont classées en cinq chémotypes. Ces résultats seront comparés avec ceux de l'analyse CPG.

### **II-3 Composition chimique de l'huile essentielle de Ravensara**

#### **aromatica**

Les compositions chimiques des huiles essentielles des feuilles des pieds-mères, des rejets et des régénérations sont résumées dans le tableau n° 23

D'après le tableau n° 23, on peut dire que :

- ❖ Dans la forêt de Morarano, le type chimique à méthyl chavicol persiste (> 80%). Donc l'huile essentielle issue des feuilles des rejets de *Ravensara aromatica* est du même chémotype que celui des pieds-mères.
- ❖ Dans la forêt de Bemanja, Besakay, le type chimique des huiles essentielles analysées est à méthyl eugénol. Les rejets ont gardé le type chimique des pieds-mères. Comme ces huiles ont été analysées différemment (pied-mère sur colonne semi-polaire (dans le laboratoire du département IAA), les rejets et régénérations sur colonne apolaire (ENCCM ou Ecole Normale Supérieure de Chimie de Montpellier 2)). Les huiles de régénération analysées sont aussi du même type chimique à Méthyl eugenol.
- ❖ Pour le cas du site d'Amparihibe, une partie de la forêt a été brûlée, les pieds-mères abattus ne sont plus repérés. Nous avons quand même trouvé des rejets (données GPS différents des pieds-mères).

Tous les résultats obtenus sont traités statistiquement.

Tableau n° 23 : Composition chimique des huiles essentielles des feuilles des pieds-mères, des rejets, et des régénérations de *Ravensara aromatica*

		Observation	$\alpha$ _Pinène	Sabinène	$\alpha$ _terpinène	$\Delta$ 3-carène	limonène	$\gamma$ -terpinène	linalool	Terpinène-4ol	M chavicol	M eugenol	(E)- $\beta$ -Caryophyl	Germacrene D
Betanimainty	Rejet	Be Rj2	0	1,2	0	0	0	0	0	3,3	0	<b>95,4</b>	0	0
		Be Rj3	0	0,7	0,6	<b>12,7</b>	7,7	0	0	1,7	1,32	12	7	6,1
		Be Rj4	0,7	5,1	0,2	0	1	0,4	0,3	2,2	1,4	<b>82,2</b>	0,5	0,4
		Be Rj5	0,6	1	0,6	<b>31</b>	4,3	0	2,5	0,4	0	4,1	11,1	5,4
Amparihibe	Rejet	A Rj1	0,4	2,7	0	0	0,6	0,5	0	0,4	<b>85,3</b>	1,1	0,1	0
		A Rj2	0	2,6	0	2,9	2	0	0	3	4,4	<b>81,7</b>	0	0
		A Rj3	2,1	0	0,4	0	<b>34,7</b>	0	5,3	0,3	5,6	0,4	4,8	17
		A Rj4	0,2	0,38	0	0	0,1	1,5	0	0,2	4,3	<b>73,8</b>	1,1	0,7
		A Rj5	3,2	<b>10</b>	0	0	9,4	0	6,7	1,9	0,6	1,8	9,1	9,6
Besakay	Pieds-mère	BsA2	15,9	<b>23,8</b>	2,8	1,4	1,5	4,8	0,5	2,4	0,3	18,6	1	5,2
		BsA1	0	<b>0</b>	0	0	3,1	0	1,8	0,5	0,8	<b>86,5</b>	2,3	1,5
	Rejet	Bs rj1	1,6	6,1	0	0	1,1	0,4	0,8	1,1	1,7	<b>78</b>	6,2	1,0
		Bs rj2	7,3	<b>28,9</b>	0	0	12,7	1,6	10,2	4,8	0,9	0	6,2	1,7
	Rejet	Bs rj3	1,6	8,6	0	0	0,9	0	1,1	0	3,6	<b>73,9</b>	1,8	0
	Régénération	Bs Rg1	0	<b>16</b>	35,6	0	4,8	7,2	1,6	0	2,1	2,1	0	0
Bemanja	Pieds-mère	Bm A5	1,7	2,8	0,2	0	3,5	0,9	0,2	0,3	1,1	<b>80,6</b>	1,5	2,1
		Bm A6	0,2	0,2	0	0	5,6	0	0,5	0	1,3	<b>85,9</b>	1,4	1,7
	Rejet	Bm rj5	1,9	3,2	0	0	0	1,3	1,3	3,7	0	<b>74,1</b>	0,5	0,2
		Bm rj6	0	0	0	0	12,4	0	0,9	3,5	15,25	<b>63,9</b>	0	0,4
	Régénération	Bm Rg1	0,7	3,6	0	0	1,5	0,2	0,1	0	1,3	<b>83,8</b>	1,3	0,1
		Bm Rg2	0,7	3,8	0	0	0,8	0,4	0,1	0	2,7	<b>83</b>	0,4	0
Morarano	Pieds-mère	Mo A38	0,1	0,4	0	0	1,6	0	1	0	<b>93,8</b>	1,6	0	0,2
		Mo A39	0,4	0,1	0	0	1,2	0,1	1,2	0	<b>91,4</b>	0,9	0,2	0,5
	Rejet	Mo rj38	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>95</b>	2,2	0,2	0,4
		Mo rj39	0,5	3	0	0	0,6	0,2	0,1	0,6	<b>88</b>	1,9	0,2	0,7

Be: Betanimainty

A: Amparihibe

Bs: Besakay

Bm: Bemanja

Mo: Morarano

An : Arbre n

Rg n : régénération n

Rj n: rejet de souche correspondant après abattage de l'arbre An

Les figures n° 20 à 25 montrent le profil chromatographique des huiles essentielles des feuilles des rejets dans la forêt de Besakay, Bemanja, Morarano.

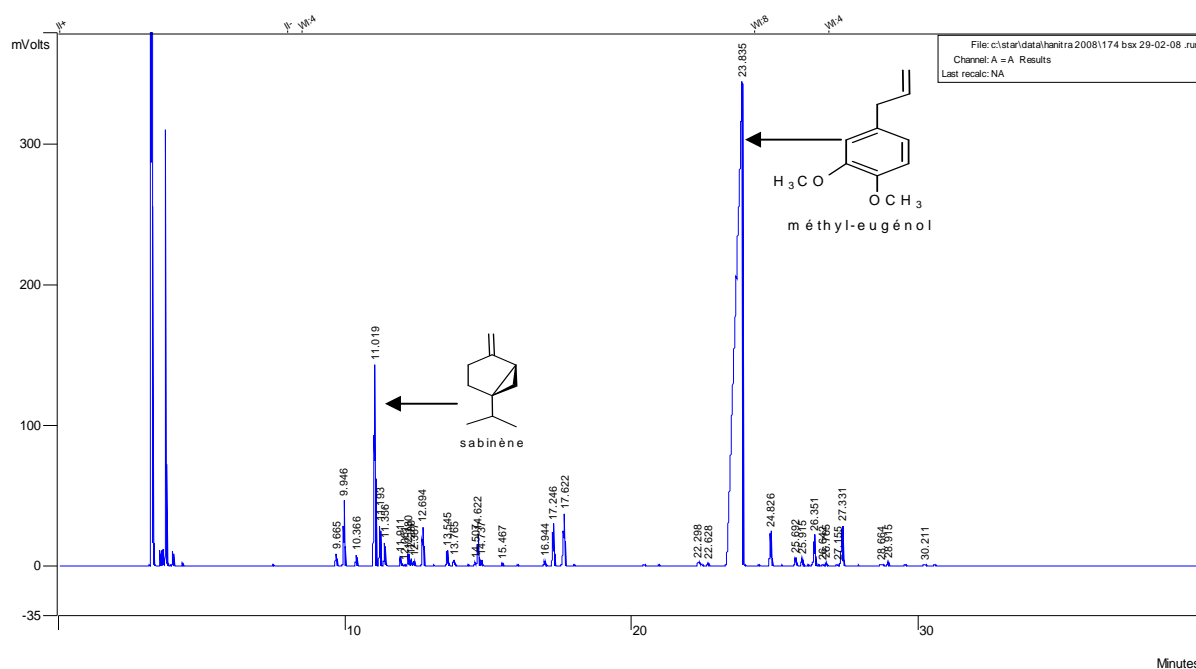


Figure n° 20: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 1 à Besakay (Bs rj1)

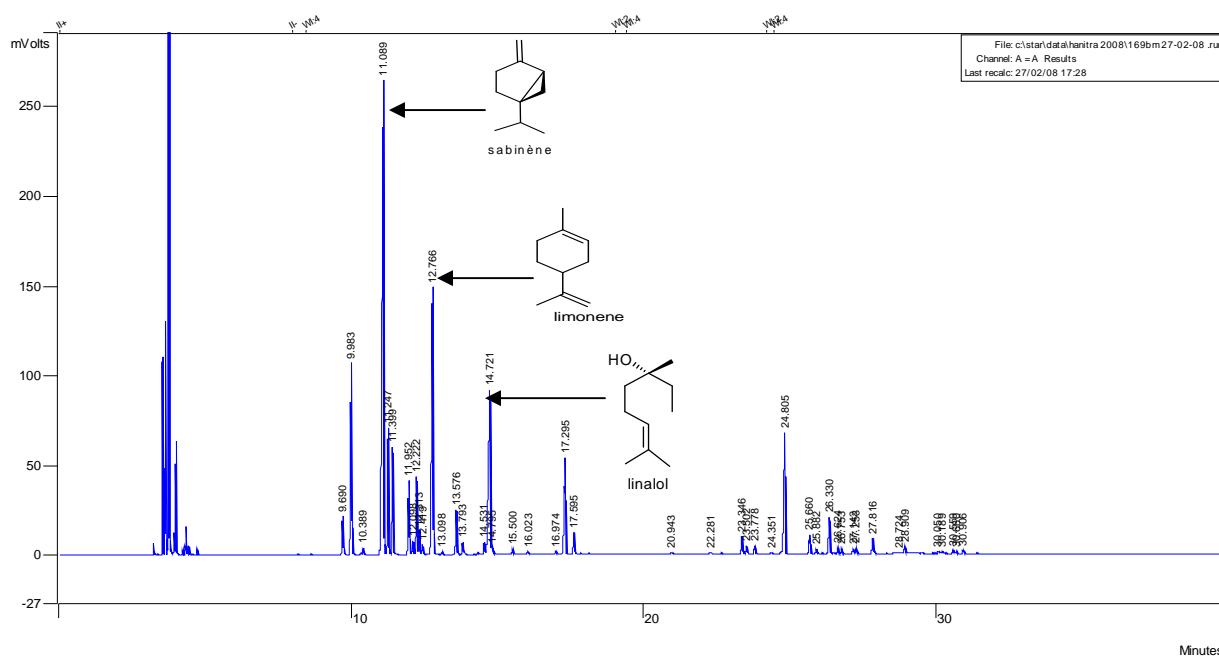


Figure n° 21: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 2 à Besakay (Bs rj2)



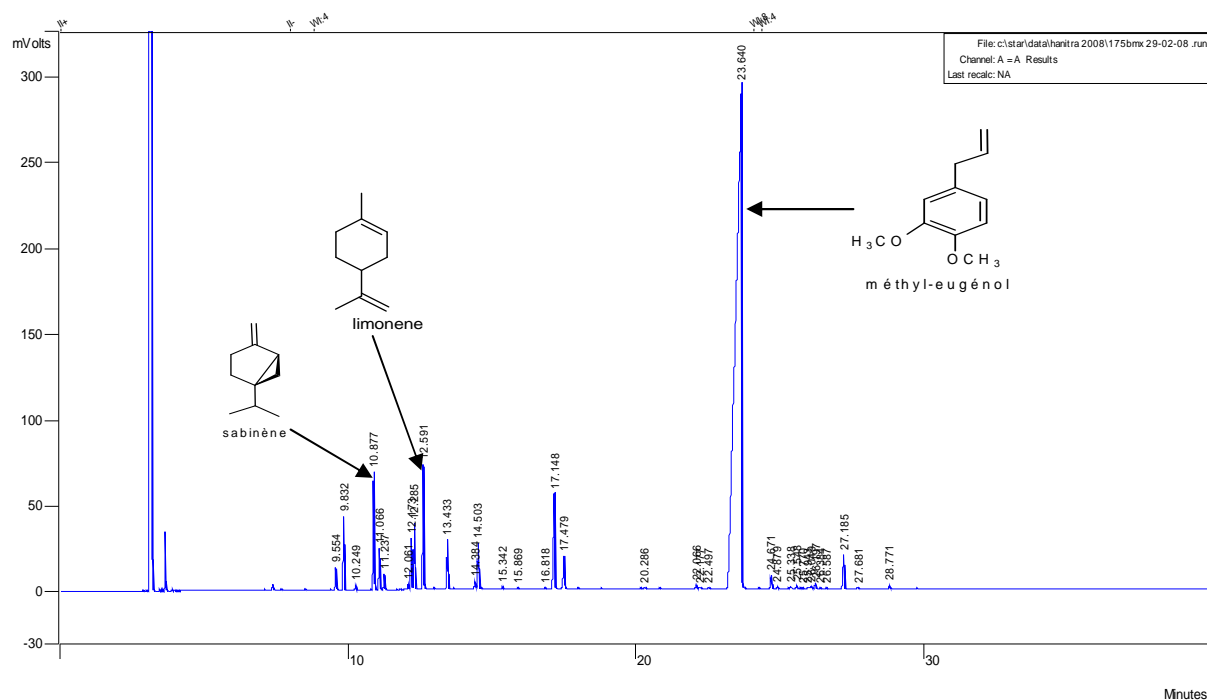


Figure n° 22: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 05 dans la forêt Bemanja (Bm rj5)

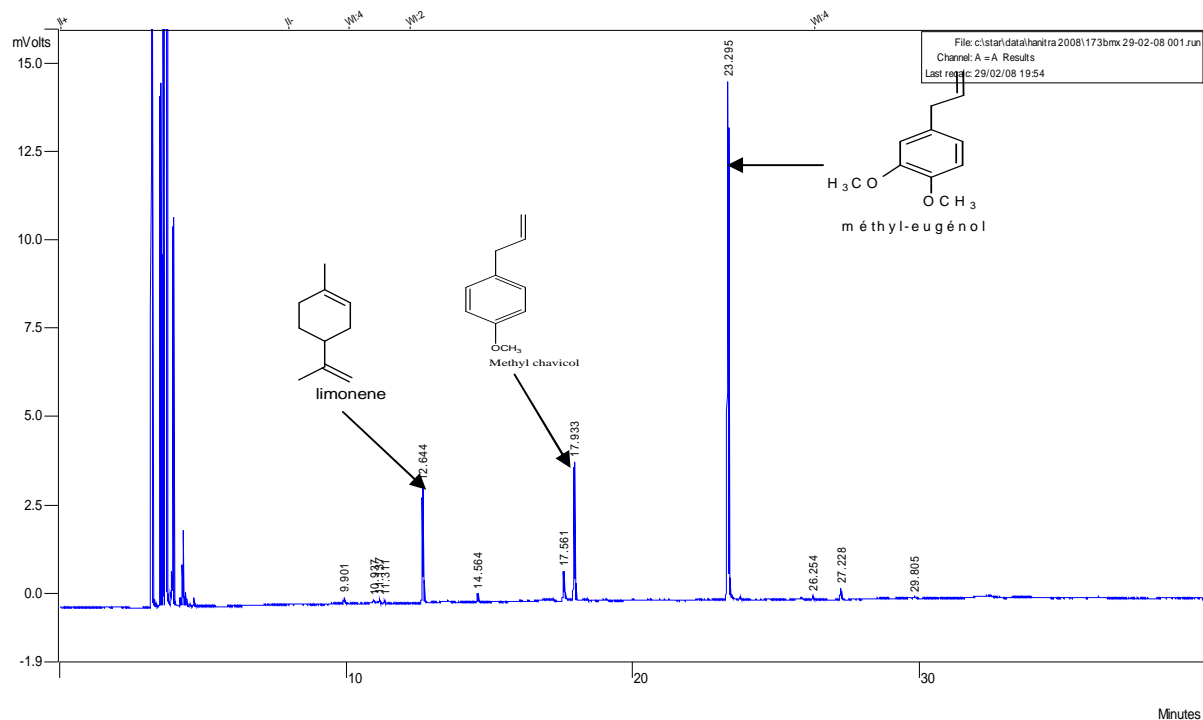


Figure n° 23: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 06 dans la forêt Bemanja (Bm rj6)

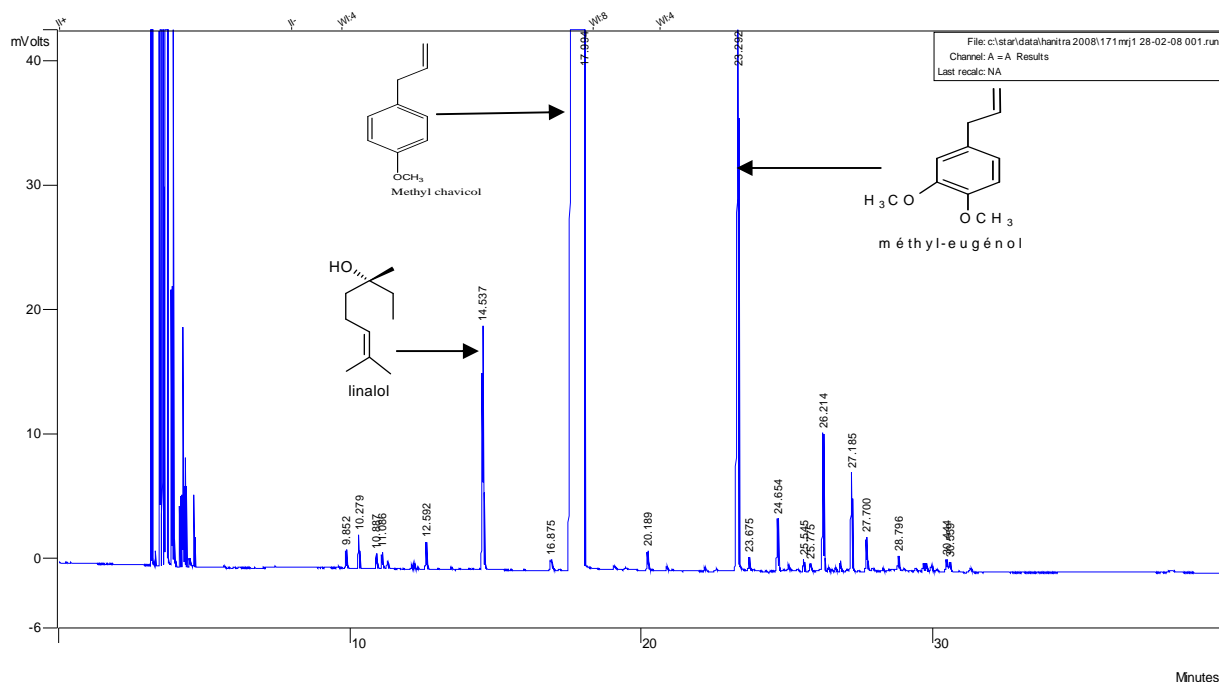


Figure n° 24: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 38 dans la forêt de Morarano (Mo rj38)

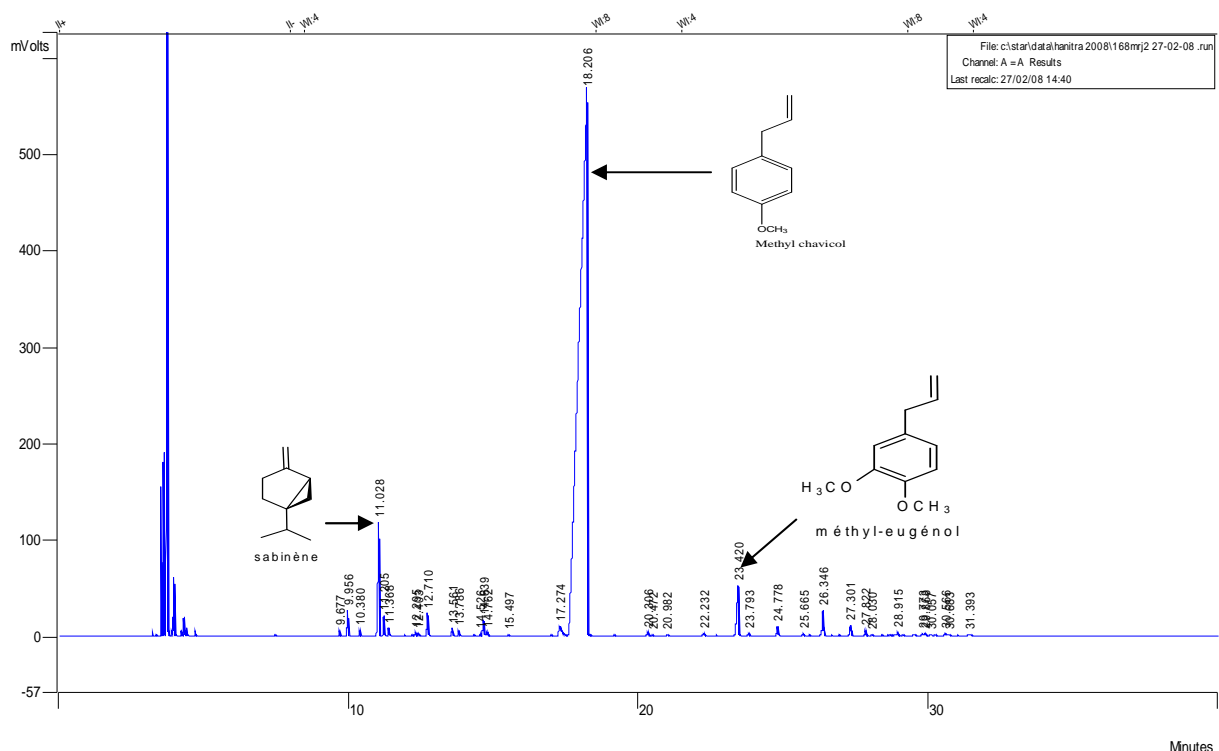


Figure n° 25: Profil chromatographique d'huile essentielle des feuilles du rejet de l'arbre 39 dans la forêt de Morarano (Mo rj39)

### **III- RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES**

#### **III-1 Résultats de l'ACP**

Pour l'analyse en composantes principales, nous avons pris en compte 12 variables comptant dans les plus discriminantes et 25 individus constitués de six pieds-mère, de seize rejets et de trois régénérations.

Les individus correspondant aux pieds-mères sont considérés comme individus supplémentaires c'est-à-dire ils ne contribuent pas à la formation des axes factoriels.

Les résultats des pieds-mères sont obtenus d'après l'étude antérieure de ANDRIANOELISOA (2006) et FALIHERRY.2004. Les rejets de souches sont collectés dans les 3 sites d'étude (Bemanja, Besakay, Morarano) tandis que d'autres rejets sont collectés dans les sites de Betanimainty. Les régénérations sont collectées à Bemaja, Besakay.

Dans un premiers temps, une analyse en composantes principales non réduite a été réalisée sur 25 individus et 12 variables.

Nous n'avons considéré que les constituants à pourcentage plus ou moins élevés car les analyses chromatographiques n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions (colonne semi-polaire pour les huiles essentielles des pieds-mères et colonne apolaire pour celles des feuilles de rejet et de régénération.

#### **III-1-1 Valeurs propres :**

Les valeurs propres des axes principaux (variance sur les axes principaux), le pourcentage des variabilités et les pourcentages cumulés des variables sont donnés dans le tableau suivant

**Tableau n° 24: Valeurs propres des axes principaux (ACP)**

	F1	F2	F3
Valeur propre	1856.266	713.107	84.451
Variabilité (%)	67.014	25.744	3.049
% cumulé	67.014	92.758	95.807

Le premier axe principal (F1) présente 67,01% de la variabilité totale tandis que la deuxième composante principale (F2) en explique 25,74%. Le troisième axe explique 3,04% de la variabilité. Les 3 premières composantes principales expliquent presque 96% de l'information totale.

Les deux premiers axes peuvent présenter les variables puisque son pourcentage cumulé est à plus de 50%.

### III-1-2 Résultats et interprétations

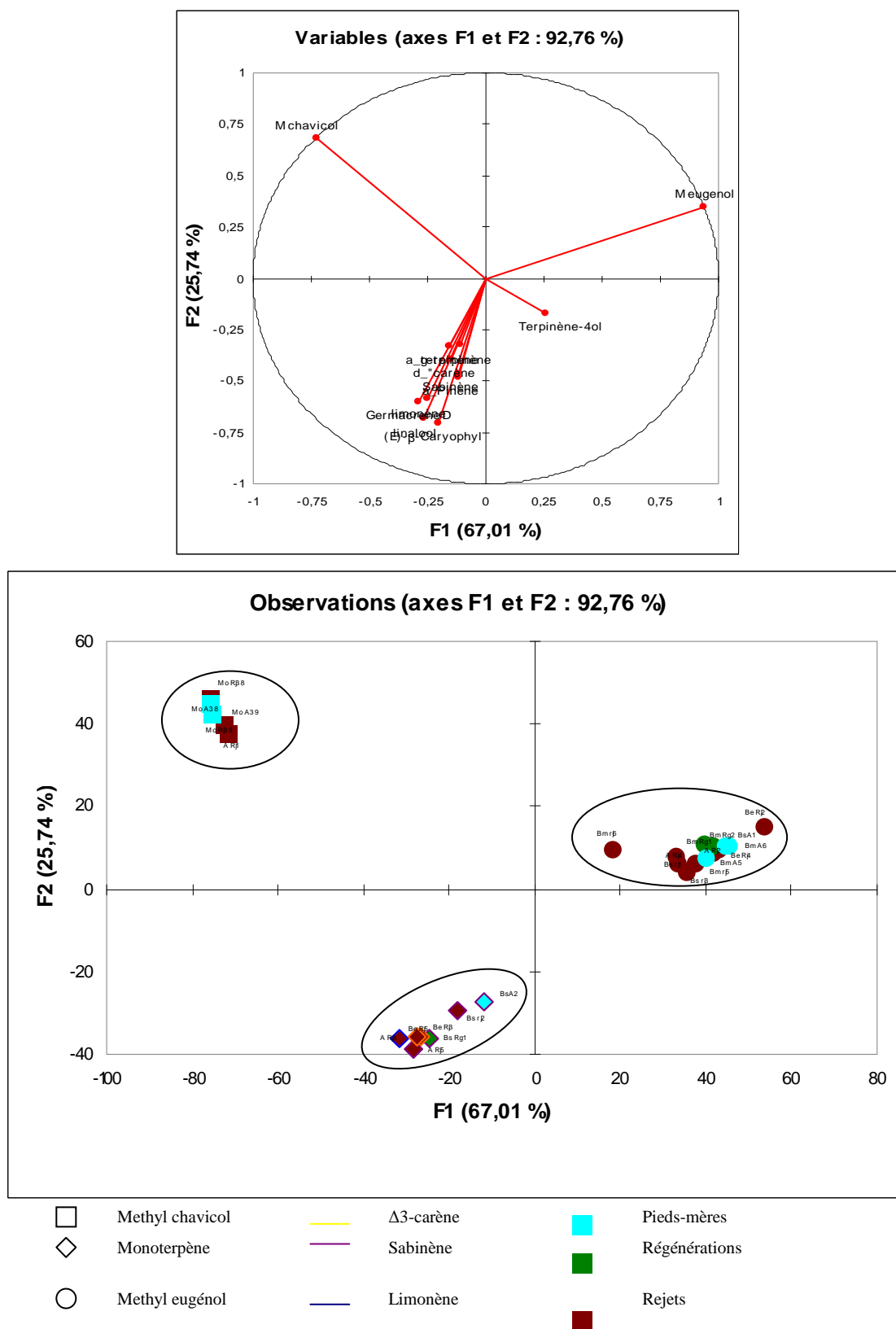


Figure n° 26: Représentations graphiques des variables et échantillons dans le plan formé par l'axe 1 et l'axe 2 montrant trois regroupements des individus des huiles essentielles des feuilles des rejets et des régénérations de *Ravensara aromatica* par l'ACP.

A première vue, trois groupes se distinguent nettement :

- Le premier groupe composé par 13 individus Be Rj2, Be Rj4, A Rj2, A Rj4, Bs rj1, Bs rj3, Bm Rg1, Bm Rg2, Bm rj5, Bm rj6, BsA1, Bm A5, Bm A6 ayant une plus forte teneur en méthyl eugenol
- Le deuxième groupe d'individus composés par 7 individus Be Rj3, Be Rj5, A Rj3, A Rj5, Bs rj2, Bs Rg1, BsA2 ayant une plus forte teneur en monoterpènes.
- Le troisième groupe composé par 5 individus A Rj1, Mo Rj38, Mo Rj39, Mo A38, Mo A39 ayant une plus forte teneur en Methyl chavicol

Dans la suite des analyses, nous considérons ces 3 premiers axes principaux dont le pourcentage cumulé est environ 96%.

Le tableau montrant le statistique simple de l'ACP est donné en annexe n° 13.

### **III-2 Résultats de CHA (Classification hiérarchique ascendante)**

Afin de visualiser les classes d'individus obtenus dans l'ACP, une classification automatique été effectuée.

D'après la figure n° 24, le dendrogramme obtenu a reparti les individus dans 3 classes distinctes (identique aux résultats obtenus par ACP). La répartition obtenue est donnée dans le tableau n°24.

La CHA a été faite en fixant le nombre de classes significatives selon le dendrogramme trouvé dans l'ACP.

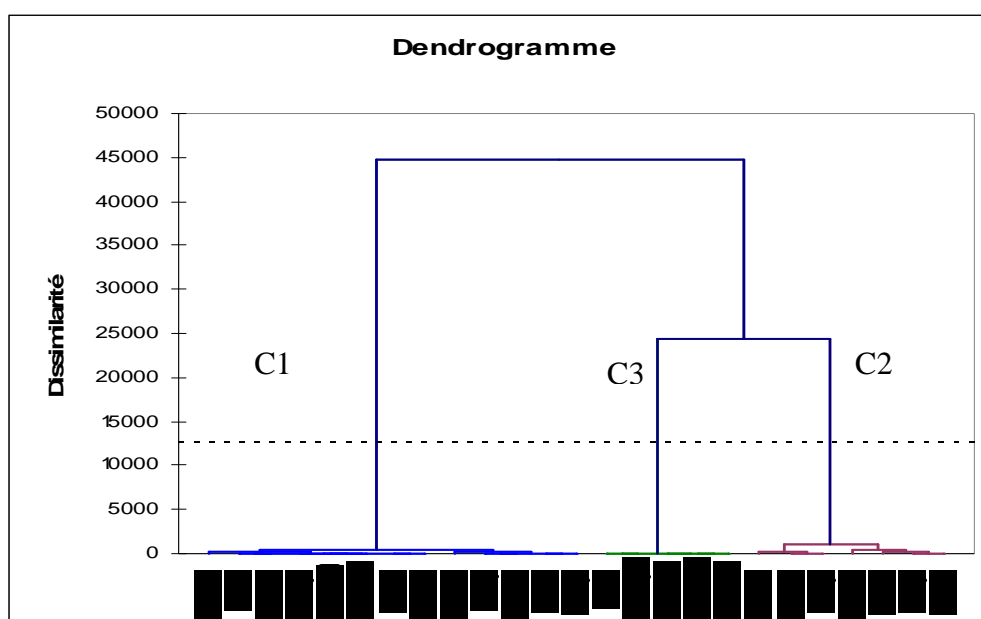


Figure n° 27: Représentation des trois classes de répartition des huiles essentielles de feuilles de *Ravensara aromatica*

**Tableau n° 25: Résultats par classe**

Classe	1	2	3
Objets	13	7	5
Somme des poids	13	7	5
Variance intra-classe	80.415	343.340	17.230
Distance minimale au barycentre	2.063	4.580	1.188
Distance moyenne au barycentre	6.717	15.497	3.418
Distance maximale au barycentre	21.185	29.863	5.413
	Be Rj2	Be Rj3	A Rj1
	Be Rj4	Be Rj5	Mo Rj38
	A Rj2	A Rj3	Mo Rj39
	A Rj4	A Rj5	Mo A38
	Bs rj1	Bs rj2	Mo A39
	Bs rj3	Bs Rg1	
	Bm Rg1	BsA2	
	Bm Rg2		
	Bm rj5		
	Bm rj6		
	BsA1		
	Bm A5		
	Bm A6		

Afin de confirmer les résultats ainsi obtenus, une AFD (Analyse Factorielle Discriminante) a été effectuée.

### **III-3 Résultats d'Analyse Factorielle Discriminante**

Les trois classes sont considérées comme variables dépendantes et les observations comme variables explicatives.

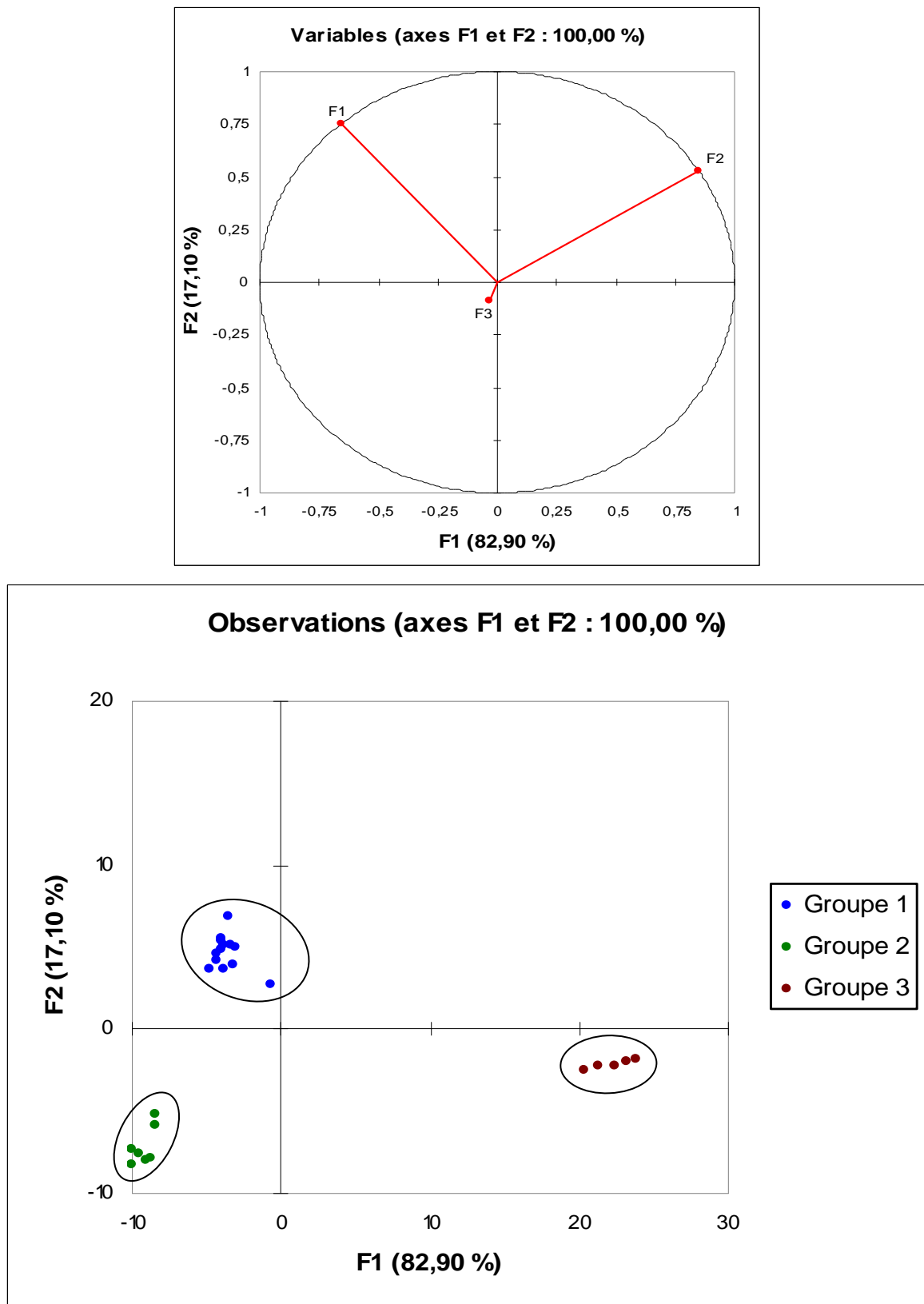


Figure n° 28: Représentation graphiques des variables et échantillons dans le plan formé par l'axe 1 et l'axe 2 montrant les trois regroupements par AFD

Les graphiques confirment que les échantillons sont bien discriminés par les deux axes factoriels obtenus à partir des variables explicatives initiales.

**Tableau°26: Matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation**

de \ Vers	1	2	3	Total	% correct
1	13	0	0	13	100.00%
2	0	7	0	7	100.00%
3	0	0	5	5	100.00%
Total	13	7	5	25	100.00%

D'après l'étude de l'analyse factorielle discriminante, les individus sont bien discriminés par les axes factoriels et les résultats de l'ACP sont confirmés à 100%.

#### **IV- CLASSES DES HUILES ESSENTIELLES OBTENUS DES FEUILLES DE REJET, DE REGENERATION DE *Ravensara aromatica***

D'après l'analyse statistique, on constate que :

- l'huile essentielle extraite de feuilles de *Ravensara aromatica* du pied-mère BsA1 (Arbre n°1 à Besakay) (référence FALIHERY, 2004) et celle du rejet Bsrj1 (rejet de l'arbre n°1 à Besakay) appartiennent à un même type chimique avec une forte teneur en méthyl eugeno (78%).
- l'huile essentielle extraite de feuilles de *Ravensara aromatica* du pied- mère BsA2 (Arbre n°2 à Besakay) (référence FALIHERY, 2004) et celle du rejet Bsrj2 (rejet de l'arbre n°2 à Besakay) appartiennent à un même type chimique avec une forte teneur en sabinène (28,9%).
- l'huile essentielle obtenue de feuilles de *Ravensara aromatica* du pied- mère BmA5, BmA6 (Arbre n°5 et 6 à Bemanja) (référence FALIHERY, 2004) et celles venant des rejets Bmrj5 et Bmrj6 (rejets de l'arbre n°5 et 6 à Bemanja) ont le même type chimique avec une forte teneur en méthyl eugenol (74,1% et 63,9%).
- Lors de la descente sur terrain, à cause du tavy, on n'a pas pu obtenir des feuilles issues de rejet des souches des pieds-mères d' Amparihibe de référence, qui ont fait partie de la forêt brûlée d'Amparihibe. On a collecté 5 nouveaux rejets dont les huiles sont analysées et classées. Le rejet 1 dans le site d'Amparihibe ARj1 est trouvé dans la classe 2 à méthyl chavicol. Les rejets ARj2 et ARj4 sont groupés dans la classe 1 à monoterpènes. ARj3 et ARj5 se sont groupés dans la classe 3 à méthyl eugenol.
- Les huiles essentielles obtenues de feuille de *Ravensara aromatica* de pied- mère MoA38, MoA39 dans le site de Morarano (ANDRIANOELISOA, 2006) et celles des



rejets MoRj38 et MoRj39 (rejet de l'arbre n°38 et 39 de la forêt de Morarano) ont le même type chimique avec une forte teneur en méthyl chavicol.

Des pieds-mères aux rejets, le chémotype est toujours conservé.

Les huiles essentielles extraite de feuilles des nouveaux rejets, régénération (dans la forêt d'Amparihibe, Betanimainty, Besakay, Bemanja) sont classées selon l'ACP.

## V- RESULTATS DE L'ANALYSE NIRS

. Des analyses statistiques ont été faites sur les résultats des spectres d'absorption pris directement sur les feuilles séchées. La moyenne des données spectrales des classes est donnée dans la figure n° 29 dans laquelle on distingue les composés terpéniques des constituants aromatiques. (ANDRIANOELISOA, 2007)

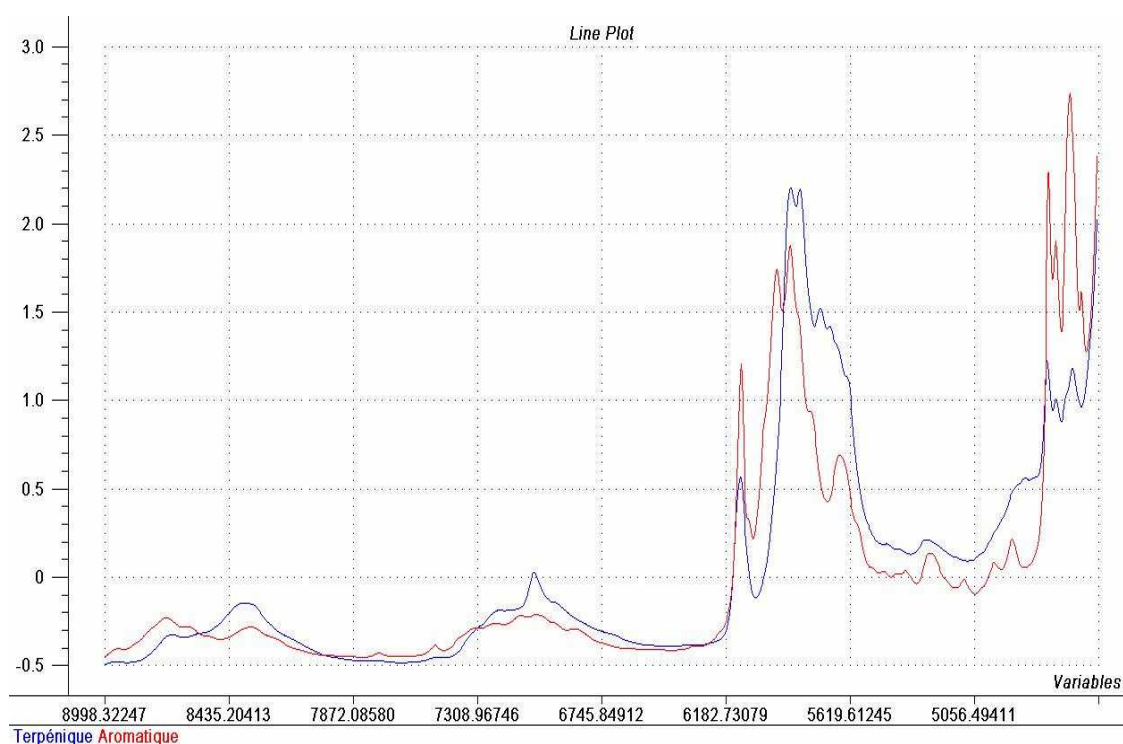


Figure n° 29: Spectres moyennés des classes des constituants aromatiques et terpéniques

Les résultats statistiques des données spectrales obtenues par la méthode NIRS sur les feuilles de *Ravensara aromatica* sont présentés dans les figures n°30 et 31.

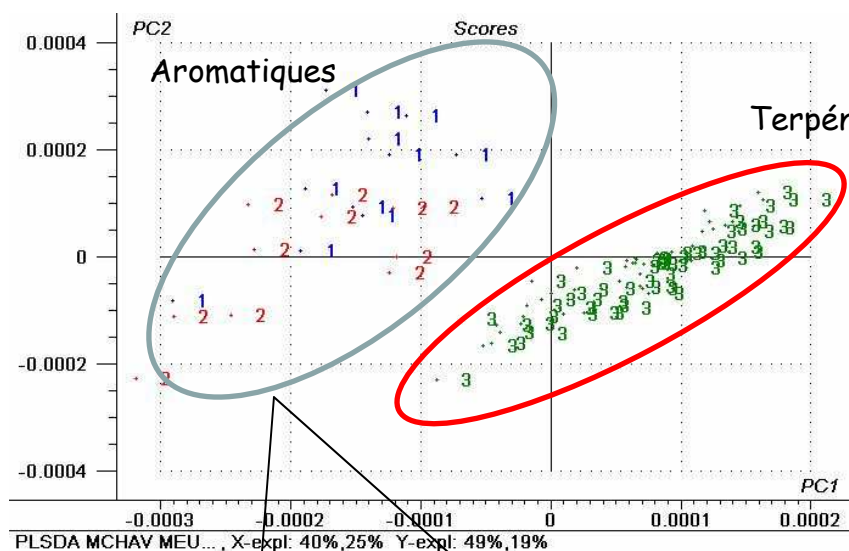


Figure n°30: Représentation graphique des individus (représentés par leur classe préétablie) par PLS (Partial Least Square ou moindres carrés partiels)

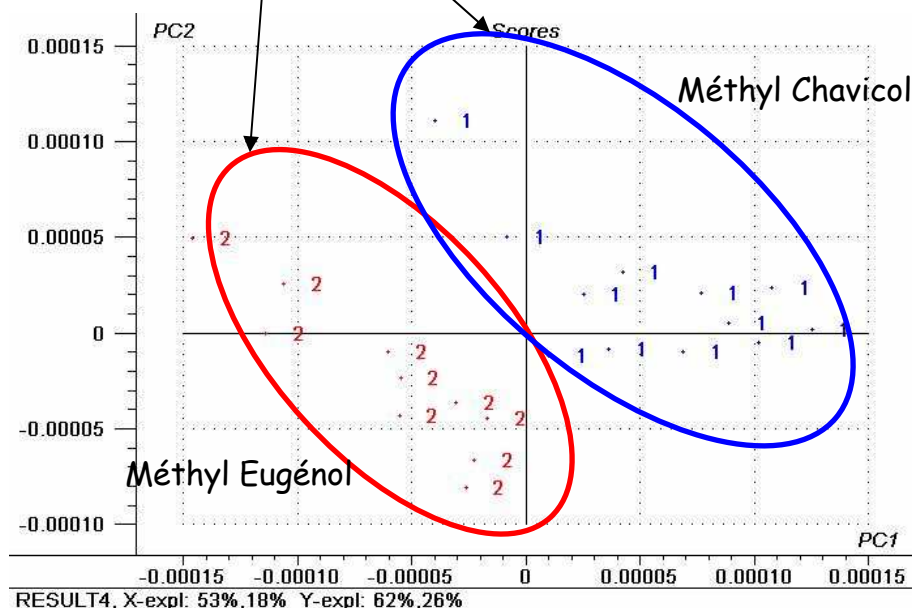


Figure n°31: Représentation graphique des individus issus du groupe des composés aromatiques

Quelques cent cinquante lots de feuilles issues d'arbres individuels ont été soumis à des analyses par la méthode NIRS. La composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles de ces arbres a été déterminée auparavant. Les résultats statistiques (ACP, CHA et AFD) sur la composition chimique de ces huiles essentielles ont permis de les regrouper dans trois principales classes chimiques :

- Classe à méthyl chavicol,
- Classe à méthyl eugénol
- Classe à monoterpènes

L'analyse chimiométrique des données spectrales des feuilles a mis en évidence deux grands groupes principaux (le groupe à composés aromatiques et celui à constituants terpéniques). Des analyses chimiométriques plus poussées ont réparti le groupe des composés aromatiques en deux sous-groupes bien distincts, la classe des méthyl chavicol et celle des méthyl eugénol.

Les classes chimiques obtenues par traitement statistique des données sur les huiles (résultats CPG) sont retrouvées dans les résultats d'analyse statistique des données d'absorption spectrale (Nirs) réalisée directement sur ces feuilles issues d'arbre de classe chimique connue. La classe chimique d'un arbre peut alors être déterminée directement sur ses feuilles sans recourir à des extractions et à des identifications chimiques y afférentes et cela grâce à la méthode Nirs. Cette nouvelle méthode de détermination de classe chimique appliquée au cas *Ravensara aromatica* est très encourageante. Son efficacité nous a orienté vers d'autres perspectives liées aux problématiques de l'étude. La méthode Nirs est pour le moment notre seul recours dans la détermination des classes chimiques de nos petites feuilles de bouture dont la classe chimique des ortets est connue. L'analyse a confirmé l'intégration des feuilles de bouture dans la même classe que leurs ortets. De même les analyses Nirs faites sur les feuilles de rejet ou de régénération traitées dans cette étude ont confirmé les résultats obtenus sur les huiles essentielles extraites du même lot de feuilles.

Le tableau des résultats d'analyse SPIR effectuée sur les feuilles prises en compte dans cette étude est récapitulé dans le tableau n° 27.

**Tableau n°27 : Résultats récapitulatifs de l'analyse SPIR sur les feuilles de boutures, rejets et régénération.**

Individus	ORTETS		BOUTURES	REJETS	REGENERATION
	Huiles (analysé par CPG)	Feuilles (analysé par SPIR)	Feuilles (analysé par SPIR)	Feuilles (analysé par SPIR)	Feuilles (analysé par SPIR)
<b>A25</b>	M. eugenol	M. eugenol	M. eugenol	-	-
<b>A26</b>	M. eugenol	M. eugenol	M. eugenol	-	-
<b>B3</b>	M. chavicol	M. chavicol	M. chavicol	-	-
<b>T1</b>	Terpénique	Terpénique	Terpénique	-	-
<b>DE17</b>	M.chavicol	M. chavicol	M. chavicol	-	-
<b>NW3</b>	Terpénique	Terpénique	Terpénique	-	-
<b>A23</b>	M. eugenol	M. eugenol	M. eugenol	-	-
<b>J3</b>	M. chavicol	M. chavicol	M. chavicol	-	-
<b>A41</b>	M. chavicol	M. chavicol	-	-	M. chavicol
<b>Bsrg1</b>	Terpénique	-	-	-	Terpénique
<b>Morj1</b>	M. chavicol	-	-	M. chavicol	-
<b>Morj2</b>	M. chavicol	-	-	M. chavicol	-
<b>Berj1</b>	Terpénique	-	-	Terpénique	-
<b>Bsrj1</b>	M. eugenol	-	-	M. eugenol	-
<b>Bsrj2</b>	M. eugenol	-	-	M. eugenol	-

<b>Bsrj3</b>	Terpénique	-	-	Terpénique	-
<b>Bmrj1</b>	M. eugenol	-	-	M. eugenol	-
<b>Bmrj2</b>	M. eugenol	-	-	M. eugenol	-
<b>Arj3</b>	Terpénique	-	-	Terpénique	-
<b>Arj5</b>	Terpénique	-	-	Terpénique	-

M. chavicol : méthyl chavicol

M. eugénol : méthyl eugénol

D'après le tableau n°27, les types chimiques à méthyl chavicol, à méthyl eugenol, terpénique reste invariable que ce soit chez les boutures que les individus de rejet. Dans le cas de la régénération naturelle le type chimique à méthyl chavicol traité est aussi invariable.

### **CONCLUSION PARTIELLE**

Dans cette partie, les résultats de bouturage ont été présentés : 569 boutures sur 708 poussent (présence de racine) et 51 boutures ont des nouvelles feuilles.

Les analyses en laboratoire ont déterminé les caractéristiques des huiles essentielles des feuilles des rejets, de régénération de *Ravensara aromatica*.

En général, les huiles essentielles présentent une couleur transparente à jaune trouble. Son odeur diffère selon son type chimique.

Dans les forêts d'Amparihibe et Bemanja, la densité des huiles essentielles de référence (0,8926 et 1,0099 à 1,0143) est toujours élevée par rapport à celle des rejets (0,8895 pour Amparihibe et 1,0126 ; 0,9549 ; 1,0945 pour Bemanja). Mais dans la forêt de Besakay, le phénomène inverse est observé : la densité de l'huile essentielle de référence (0,8999) est inférieure à celle des rejets (1,0031 et 0,9793). L'indice de réfraction de l'huile essentielle des rejets ou des régénérations est très variable : elle peut être supérieure ou inférieure chez les huiles issues des pieds- mères. Elle varie en fonction du lieu de collecte. Enfin, la teneur en huile essentielle des pieds- mère est inférieure ou égale à celle des rejets ou régénérations. Cas d'Amparihibe et Bemanja : la teneur en huile essentielle des pieds-mères varient de 0,05 à 0,07% et 0,12 à 1,16% alors que celle des rejets varie de 0,12 à 2,26% (Amparihibe) et 0,57 à 4,83% (Bemanja).

L'analyse chromatographique en phase gazeuse des échantillons montre que les types chimiques des huiles essentielles se transfèrent d'une génération à l'autre pour les cas étudiés.

- L'étude statistique des résultats d'analyses chromatographiques par l'ACP puis par CHA et enfin par AFD a permis de classer en trois les huiles essentielles obtenues des rejets et de régénération

- l'analyse NIRS sur les feuilles a permis de distinguer les données spectrales en 2 grands groupes (groupe aromatique et groupe terpénique). L'analyse chimiométrique ultérieure a réparti le groupe aromatique en 2 autres classes, classe à methyl chavicol et classe à methyl eugenol. Trois types chimiques sont bien déterminés.

Les résultats de l'analyse SPIR des feuilles de bouture et de régénération montrent que le type chimique d'un pied mère, les clones et les régénérations ne varie pas.

. L'analyse SPIR des feuilles de *Ravensara aromatica* montre les résultats chimiométriques des données spectrales qui distinguent trois classes : classe des constituants terpéniques, et celles des aromatiques composées de classe de methyl chavicol et classe du methyl eugénol.

# **CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

Plante endémique de la famille des Lauracées, *Ravensara aromatica*, s'adapte parfaitement sur la côte Est et elle est assez fréquente à une altitude de 1000m à 1400m. Les vertus curatives, cosmétiques, arômes alimentaires de l'huile essentielle de feuille de *Ravensara aromatica* sont reconnues. Ce qui a mérité des études complémentaires approfondies sur les effets de traitement sylvicole sur l'évolution des chémotypes de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* des diverses forêts de Madagascar.

Le bouturage permet d'obtenir en grand nombre d'exemplaires la copie exacte de chaque chémotype.

Les travaux au laboratoire ont montré que la teneur en huile essentielle des feuilles des pieds – mère (0,05% – 1,16%) est inférieure ou égale à celle issue des rejets ou régénérations (0,12 %– 4,83%). La densité relative et l'indice de réfraction de l'huile essentielle des rejets ou des régénérations sont très variables, elles peuvent être supérieure ou inférieure à celles des références (pied-mère). L'analyse chromatographique en phase gazeuse des échantillons ainsi que l'étude statistique montrent que les chémotypes de l'huile essentielle se transmettent des pieds- mère aux rejets :

- L'huile essentielle des feuilles des arbres n°1 et 2 dans la forêt de Morarano contiennent respectivement 93,8 et 91,4% de méthyl chavicol alors que les huiles essentielles de ces rejets présentent respectivement 95 et 88% de méthyl chavicol.
- Dans la forêt de Besakay, l'huile essentielle de l'arbre n°1 contient 86,5% de méthyl eugenol, le rejet de cet arbre présente un pourcentage élevé (78,0%) de méthyl eugenol. L'arbre n°2 donne une huile essentielle riche en sabinène (23,8%), son rejet présente aussi 28,9% de ce constituant.

Un rejet et une régénération de pied mère inconnu ont été trouvés dans ce site, l'analyse de leur huile a été faite. L'huile essentielle de rejet est riche en méthyl eugenol avec un pourcentage de 73,9% tandis que celle de la régénération contient 16% de sabinène.

- Dans la forêt de Bemanja, les huiles essentielles des arbres n°5 et 6 sont riches en méthyl eugenol ; l'analyse CPG montre que les huiles essentielles des rejets de ces arbres présentent respectivement 74,1 et 63,9% de méthyl eugenol.

Les deux régénérations dans la forêt de Bemanja sont aussi riches en méthyl eugenol avec un pourcentage de 83,8 et 83 %.

- Les analyses statistiques successives dont l'ACP, la CHA et l'AFD ont permis de montrer que les huiles essentielles des rejets dans la forêt d'Amparihibe sont groupés en trois groupes : celles du premier groupe sont constituées essentiellement par le méthyl eugénol (73,8 et 81,7%) constitué de deux échantillons, tandis que celles du deuxième groupe est composé de monoterpènes (43,7% de limonène et 10% de sabinène) rassemblant deux échantillons. Celle du troisième groupe avec un seul échantillon à une forte teneur en méthyl chavicol (85,3%).
- Dans le site de Betanimainty, quatre rejets sont collectés dont deux sont riches en méthyl eugénol de 95,4 et 82,2%, et deux riches en  $\Delta^3$ -carène avec un pourcentage de 12,7 et 31%.

L'analyse SPIR montre que le type chimique d'huile essentielle des feuilles de *Ravensara aromatica* se garde d'un ortet à la bouture ou à la régénération. Et l'analyse chimiométrique des données spectrales des feuilles de *Havozo* montre que les feuilles de boutures ont la même classe que les feuilles des ortets et elles sont toujours classées en trois classes bien distinctes : la classe des terpéniques, celle à méthyl chavicol et celle à méthyl eugénol.



# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANDRIANOELISOA, S. H., MENUT, C., COLLAS, P. et DANTHU, P. ; 2006 ; Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils from *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar ; *Flav. Fragr. J.*; **21** ; 833 – 838.
- 2- ANONYME ; 2003 ; Monographie de la région d'Ambatondrazaka ; Unité de Politique pour le Développement Rural ; Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche.
- 3- CABANIS, Y., CHABOUIS, F., 1970, Végétaux et groupements végétaux de Madagascar et des Mascareignes. Tome2, B.D.P.A., Antananarivo.
- 4- CEDRIC R, R.; 2006; Différents types de bouture ; [en ligne] cité le 14/02/08 sur [www.riccedricdesing.com/bonsai/fiches\\_pratiques/bouturage-bonsai-html](http://www.riccedricdesing.com/bonsai/fiches_pratiques/bouturage-bonsai-html).
- 5- DANTHU, P., SOLOVIEW, P., GAYE, A., SECK, M., THOMAS, I., 2002. Vegetative propagation of some West African Ficus species by cuttings; *Agroforestry systems* **55**: 57 – 63.
- 6- FRANCHOMME, P., 1995, L'aromathérapie exactement. Ed. JOLLOIS Roger. Limoges.
- 7- GROEBEL, A.; LENOIR D. ; PERNET, R., 1970, Uber die Inhaltsstoffe aus *Ravensara aromatica*, einer auf Madagaskar. Vorkommenden Lauracee. *Planta Med*, **18**, n°1, 66-72.
- 8- HELLER, R., ESNAULT, R., Lance, C., 1995. Physiologie végétale, Tome 2, 5<sup>ème</sup> édition Masson, Paris France, 315p.
- 9- HELVELA ; 2006 ; Huile essentielle de *Ravensara aromatica* [en ligne] cité le 09/11/2007 sur [www.penntybio.com/huiles/huile-essentielle-ravensare.htm](http://www.penntybio.com/huiles/huile-essentielle-ravensare.htm) -

10- HELVET'AROMA, 2000, Les huiles essentielles. [en ligne] cité le 10/12/07 sur <http://www.dietaroma.com/fr/huile.htm>

11- HUMBER, T., H., 1952. Flores de Madagascar et des Comores (plantes vasculaires), Gouvernement général de Madagascar, 81<sup>ème</sup> famille (Lauracées), 96<sup>ème</sup> famille (Rosacées), 115<sup>ème</sup> famille (Aquifoliacées), 140<sup>ème</sup> famille (Flacourtiacées), Paris France.

12- KOSTERMANS, A.G.H, 1950. Flore de Madagascar et Comores, 81<sup>ème</sup> famille : LAURACEES, 50-52. Typographie FIRMIN-DIDOT et Compagnie 56, rue Jacob. Paris.

13- KOUMAGLO, Avant d'entrer dans le vif du sujet, pouvez-vous nous dire ce qu'est un arôme, ainsi qu'une huile essentielle? Magazine Partenaire Économique International.[en ligne] cité le 11/12/07 sur <http://www.dicodunet.com/annuaire/def-1730-aromatherapie>.

14- LABEL CBD, « Conservation – Biodiversité – Développement », Etude de marché sur l'huile essentielle de *Ravensara aromatica*, Projet FFEM BIODIVERSITE, 8p.

15- LEMEN ; 2006 ; Technique expérimentale de la chromatographie en phase gazeuse ; [en ligne] cité le 21/01/08 sur [www.iut.lannion.fr/LEMEN/Mpdoc/CHIMIE/Chimie1/CHROMGAZ.HTM](http://www.iut.lannion.fr/LEMEN/Mpdoc/CHIMIE/Chimie1/CHROMGAZ.HTM) - 9k

16- MALHEBIAU, P., 1994. La nouvelle aromathérapie. Editions Jakin. S.L. France.

17- RAKOTOMARO, N.J. ; RAZAFINDRASATA, A.F. ; RAZAKAMANANA, R. ; RAFILIPOARIJAONA, H., 2000, Inventaire de *Ravensara aromatica* Sonnerat, de *Ravensara crassifolia*, de *Rhus taratana*, et de *Canarium madagascariensis* dans la région de collecte de BioSave Moramanga. L'Homme et l'Environnement projet env.32/99.Antananarivo

18- RAMANOELINA, A. R. P., RASOARAHONA, J. R. et GAYDOU, E. M. ; 2006 ; Chemical composition of *Ravensara aromatica* Sonnerat. Leaf essential oils from Madagascar ; *J. Essent. Oil Res.* ; **18** ; 215-217

- 19- RAMANOELINA, A.R.P., 1997, Industries des plantes aromatiques, huiles essentielles et extraits. Polycopie I.A.A- E.S.S.A ; Université d'Antananarivo
- 20- RAMAROSON, N. ; 2006 ; Essais de propagation végétative de quelques essences ligneuses productrices d'huiles essentielles et de molécules à usage médicale ; Mémoire de fin d'études d'ingénieur, département Eaux et Forêts – ESSA ; Université d'Antananarivo.
- 21- RANDRIAMPARANY, N. F. C. ; 2005 ; Contribution à l'étude prospective des potentialités écologiques en *Ravensara aromatica* Sonnerat en vue d'une proposition de gestion de son exploitation : cas de la forêt classée d'Ambohilero-Commune de Didy-district d'Ambatondrazaka-région Alaotra Mangoro ; Mémoire de fin d'études d'ingénieur, département Eaux et Forêts, ESSA ; Université d'Antananarivo.
- 22- RAOBELISON, 2003, Contribution de la variabilité qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* Sonnerat dans la région de Betanimainty, Mémoire d'Ingénieur, département I.A.A-E.S.S.A- Université d' Antananarivo.
- 23- RAZAFIMAMONJISON (D.E.N.G), 2005, Contribution à l'étude de la variation saisonnière des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* Sonnerat dans la région de Moramanga, Mémoire d'Ingénieur, département I.A.A-E.S.S.A-.Université d'Antananarivo.
- 24- RENE, L. ; 2005 ; La chromatographie en phase gazeuse ;[en ligne] cité le 21/1/08 sur [www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A3.html](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A3.html) - 8k -
- 25- SNGF, 16 – 17 juin 1999, Atelier national sur les ressources phytogénétiques forestières, Hilton Madagascar, Rapport de restitution, 5p
- 26- VANHOVE, M. ; VIAUD, H., 1993. Les huiles essentielles qualité distillation. [en ligne] Cité le 23/ 01/08 sur <http://www.nature-helps.com/France/viaud1.htm>
- 27- WIELY ; 2001 ; Spectroscopie proche infrarouge ; [en ligne] cité le 11/12/07 sur [www.membres.lycos.fr/nirspectroscopy/](http://www.membres.lycos.fr/nirspectroscopy/) - 6k

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## PARTIE EXPERIMENTALE

### PROTOCOLE DE BOUTURAGE

- ✓ Récupérer un rameau en bonne santé d'environ 10 à 20 cm.
- ✓ Opérer une coupe nette, perpendiculaire à la tige, au-dessous d'un nœud.
- ✓ Réduire une partie du feuillage afin de limiter l'évaporation foliaire.
- ✓ Enlever les fleurs et les boutons floraux s'il en existe sur la plante.
- ✓ Accessoirement et pour faciliter la formation des racines, vous pouvez légèrement tremper le bas de votre bouture dans l'hormone de bouturage, secouer bien votre bouture pour enlever l'excédent de poudre.

La bouture devra être plantée dans un substrat aéré, léger et poreux

### PROTOCOLE DE DETERMINATION DE L'HUMIDITE PAR SECHAGE

- Peser 5 x 2g d'échantillon (avec une précision de 0,002g) et sécher à l'étuve à  $105\pm 3^{\circ}$  pendant 3 – 4h.
- Mettre les échantillons au dessiccateur contenant du silicagel à chaque sortie de l'étuve avant pesage afin de les refroidir.
- Peser les échantillons et les remettre dans l'étuve pendant une heure.
- Répéter le séchage jusqu'à l'obtention du poids constant de l'échantillon

Le poids constant est atteint lorsque la différence entre deux poids successifs est inférieure à 1% du poids de l'échantillon initial.

Soit : A le poids de l'échantillon initial

B le poids final de l'échantillon après séchage

L'humidité H de l'échantillon sera :

$$H = \frac{B}{A} \times 100 \%$$

On peut calculer le poids sec d'un échantillon à partir du coefficient de siccité  $S$  tel que :

$$S = \frac{100 - H}{100}$$

Le poids sec d'un matériel est égal à :

$$P_{\text{sec}} = P_{\text{initial}} \times S$$

## PROTOCOLE DE L'HYDRODISTILLATION

- Peser 300 à 400 g de l'échantillon à distiller avec une précision de 0,002g près.
- Introduire dans un ballon rodé propre de 2l
- Ajouter 1 à 1,5 l d'eau
- Raccorder le ballon avec l'essencier et le réfrigérant bien propres
- Allumer le bec bunsen (l'intensité du feu est réglé en minimum possible pour faire bouillir le contenu du ballon)
- S'assurer que l'eau du réfrigérant et l'eau de l'essencier circulent bien.
- Le temps de sortie de la première goutte marque le début de la distillation
- La distillation dure au moins 3h suivant les consignes. La durée dépend de l'espèce à distiller
- Remplir au fur et à mesure la fiche de distillation à chaque distillation
- Après chaque distillation, assure que tout le dispositif (ballon, essencier et réfrigérant) est bien propre.

## PROTOCOLE D'ANALYSES PHYSICO – CHIMIQUES D'HUILE ESSENTIELLE

**1) Mesure de densité relative (NF T 75 – 111)***\*Appareillages et réactifs:*

Appareillages	Réactifs
-Pycnomètre -Balance analytique à $10^{-4}$ g près -Etuve -Papier Joseph	-Eau distillé -Alcool 90°

*\*Mode opératoire:*

- Peser le pycnomètre vide parfaitement propre et sec ;
- Remplir avec de l'eau distillée ;
- Ajuster le niveau de l'eau jusqu'au repère et poser après un soigneux essuyage du pycnomètre ;
- Vider et rincer le pycnomètre avec un peu d'alcool. Sécher à l'étuve ;
- Remplir le pycnomètre d'huile essentielle et ajuster le niveau de l'huile essentielle jusqu'au trait de repère ;
- Bien essuyer le pycnomètre et peser ;
- Vider et puis rincer le pycnomètre de l'hexane puis de l'alcool ;
- Sécher le à l'étuve.

**2) Mesure de l'indice de réfraction : (NF T 75 – 112)***\*Appareillages et réactifs*

Appareillages	Réactifs
- Réfractomètre d'ABBE, marque CARL ZEISS - Papier joseph	-Eau distillée

*\*Mode opératoire:*

- Laver les prismes du réfractomètre à l'eau distillée avec du papier Joseph en évitant de les gratter ;



- Etalonner avec l'eau distillée ;
- Laisser les échantillons exposer à l'atmosphère ambiante,
- Choisir la température de travail (température ambiante)
- Verser 1 ou 2 gouttes d'huile essentielle entre les prismes ;
- Déplacer la lunette de visée pour que la ligne de séparation de la plage claire et de la plage sombre se situe à la croisée des fils du réticule ;
- Lire l'indice de réfraction de l'essence à la température  $t$  ;
- Faire trois lectures et prendre la moyenne ;
- Bien nettoyer le tube après emploi.

### 3) Analyse chromatographique (NF T 75 – 401)

*\* Conditions opératoires:*

<b>Colonne</b>	<b>Capillaire en silice fondue DB-WAX, longueur 25m</b>
Température de la colonne	60 – 220°C à raison de 3°C / mm
Injecteur	En verre
Détecteur à ionisation de flamme	220°C
Gaz vecteur	Hydrogène
Durée	40 mn par échantillon (quantité injectée 0,1µl)

*\*Mode opératoire :*

- S'assurer que l'appareil est prêt à fonctionner ;
- Brancher le chromatographe sous tension électrique ;
- Faire passer le gaz vecteur ;
- Chauffer la température à la température souhaitée ;
- Chauffer l'injecteur à la température convenable ;
- Chauffer le détecteur à la température convenable ;
- Brancher l'enregistreur en précisant les différents paramètres (vitesse de déroulement du papier, atténuation,...) ;
- Allumer le détecteur ;
- Laisser stabiliser les températures pendant un certain temps ;
- Injecter du solvant pour contrôler le bon fonctionnement de l'appareil ;

- Effectuer l'injection de l'échantillon, au niveau de l'injecteur.

## ***PROTOCOLE DU TEST OLFACTIF SUR LES ECHANTILLONS D'HUILES ESSENTIELLES DE RAVENSARA AROMATICA***

- Coder les échantillons à tester de 1 à 33 et les échantillons déjà analysés de A à J
- Préparer des papiers blancs (pour écraser les feuilles) et des touches (pour renifler l'huile essentielle) ; chaque papier ou touche porte un numéro d'échantillon
- Préparer le questionnaire : il consiste à cocher le numéro de l'échantillon où l'on sent l'odeur d'anis
- Avec 06 testeurs, faire sentir ou renifler un à un tous les échantillon en prenant comme témoins un échantillon déjà analysé où l'odeur d'anis est très forte
- Chaque individu doit cocher de l'échantillon où il sent l'odeur d'anis.

# **ANNEXES**

# ANNEXE

## ANNEXE N° 01: EXTRACTION PAR PRESSION, PAR ENFLEURAGE, PAR CO<sub>2</sub> LIQUIDE

### **Extraction par pression :**

La technique de l'expression à froid est réservée aux agrumes. L'huile essentielle des agrumes est contenue dans de petites poches situées sur la peau du fruit. Pour en obtenir la plus grande quantité, on gratte le zeste puis on utilise des presses hydrauliques. La pulpe et l'huile essentielle sont ensuite séparées à la centrifugeuse.

### **Extraction par enfleurage :**

La technique de l'enfleurage (ou macération) est ancienne, et n'est plus guère utilisée. Elle concerne les plantes ou parties de plantes dont l'arôme est trop fragile pour supporter la chaleur d'une distillation. Elle consiste à étendre une couche de ces substances végétales fragiles entre deux couches épaisses de matière grasse. Après avoir renouvelé les matières végétales plusieurs fois, la couche de graisse s'imprègne du parfum de la plante. On débarrasse alors le parfum de l'excédent gras et l'on obtient une absolue, une huile essentielle de très haute qualité olfactive.

### **Extraction par CO<sub>2</sub> liquide :**

L'extraction par CO<sub>2</sub> liquide est utilisée en brasserie pour obtenir des extraits de houblon, semblait à priori intéressante d'une part pour augmenter le rendement dans le cas de plantes plus riches en huiles essentielles d'autre part le CO<sub>2</sub> s'évaporant complètement ne laissait aucune trace toxique dans l'huile essentielle. Le produit obtenu était olfactivement moins fin et surtout les chromatographies étaient très différentes.

## **ANNEXE N° 02: FICHE DE COLLECTE**

Nom scientifique :

Famille :

Nom vernaculaire :

Date:

Nom du collecteur :

Température journalière :

Altitude:

Caractéristique de l'arbre:

- Code de l'arbre:
- hauteur
- diamètre :
- forme des feuilles:
- Couleur des feuilles / racines / écorces :
- Poids des feuilles / racines / écorces cueillie :
- Etat sanitaire des feuilles / racines / écorces cueillie :
- Observations :

### ANNEXE N° 03: COORDONNEES GEOGRAPHIQUES DE LA ZONE DE COLLECTE DE *RAVENSARA AROMATICA*

Zone délimitée	Code de l'arbre	Latitude	Longitude
Forêt de Besakay	BSXrj1	19° 00' 13,2''	048° 24' 17,4''
	BSXrg1	19° 00' 12,6''	048° 24' 15,6''
	BSXrj2	19° 00' 12,7''	048° 24' 15,5''
Forêt de Bemanja	BMXrj1	19° 00' 13,8''	048° 24' 29,9''
	BMXrj2	19° 00' 13,2''	048° 24' 17,4''
	BMXrj3	19° 00' 10,5''	048° 24' 29,9''
	BMXrg1	19° 00' 13,2''	048° 24' 17,4''
	BMXrg2	19° 00' 13,5''	048° 24' 17,4''
Forêt d'Amparihibe	AXrj1	19° 01' 07,0''	048° 24' 21,4''
	AXrj2	19° 01' 06,6''	048° 24' 21,4''
	AXrj3	19° 01' 05,9''	048° 24' 21,4''
	AXrj4	19° 01' 03,5''	048° 24' 22,8''
	AXrj5	19° 00' 58,4''	048° 24' 08,6''
Forêt d'Ampasina – Betanimainty		18° 58' 02'' à 19° 03' 54''	048° 22' 41'' à 048° 26' 10''
Forêt de Didy		18° 07' 00''	48° 33' 00''
Forêt de Raboana		18° 40' 00''	48° 17' 00''
Forêt d'Anosibeana		19° 26' 00''	48° 12' 00''

## ANNEXE N° 04 : FICHE DE DISTILLATION DE *RAVENSARA AROMATICA*

Code	N° flacon d'huile essentielle	Heure de première goutte	Heure de prélèvement d'huile essentielle	Quantité des feuilles/ ecorces/ racine à distillé	Quantité d'huile essentielle	Couleur huile essentielle	Présence d'H. léger / H. lourd	Obs erva tion

## ANNEXE N° 05 : FICHE TECHNIQUE DE DISTILLATION DE *RAVENSARA AROMATICA*

**Procédé d'obtention** : Distillation complète par entraînement à la vapeur d'eau

**Organe distillé** : feuille

**Nom botanique** : *Ravensara aromatica* Sonnerat

**Pays d'origine** : Madagascar

**Culture** : sauvage

**Autres dénominations** : *ravensara aromatique*

**Qualité** : 100% pure et naturelle

**Distillation** : Janvier 2008

# **ANNEXE N° 06: TEST OLFACTIF SUR LES HUILES ESSENTIELLES COLLECTEES DANS LES FORETS DE BETANIMAINTY ET MORARANO**

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>
<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>																	

<b>Témoin</b>									
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>

**N.B. cocher les cases au cas où on sent une odeur d'anis**



## ANNEXE N° 07 : MESURE DE POUVOIR ROTATOIRE, INDICE D'ESTER, INDICE D'ACIDE

### Mesure de pouvoir rotatoire :

Le pouvoir rotatoire  $\alpha^t_D$  : la capacité de faire dévier à droite (dextrogyre) ou à gauche (lévogyre) le plan de polarisation de la lumière.

Il permet de détecter une origine non naturelle à certaines molécules aromatiques.

Le pouvoir rotatoire d'une huile essentielle est donc l'angle évalué à l'aide d'un polarimètre, exprimé en milli radians et/ou degré d'angle, dont on tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde  $589,3 \pm 0,3$  nm, correspondant au raie de sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100mm d'huile essentielle dans des conditions déterminées de température.

Si le mesurage est effectué sur une épaisseur différente, la valeur de  $\alpha^t_D$  doit être ramenée, par le calcul, à une épaisseur de 100mm.

Le pouvoir rotatoire est donné par :

$$\alpha^t_D = \left[ \frac{A}{I} \right] \times 100$$

Où :

A : valeur d'angle de rotation, exprimée en degrés d'angle

I : longueur du tube utilisé exprimé en millimètres

.

### Mesure de l'indice d'ester :

L'indice d'ester noté I.E est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle.

L'Indice d'Ester est obtenu par l'hydrolyse des esters par chauffage en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium, et de titrer l'excès d'alcali en fin de saponification.

$$IE = 28,05 \times \left[ \frac{V_0 - V_1}{m} \right]$$

Où :

$V_0$  : volume de la solution d'HCl pour l'essai à blanc (ml)

$V_1$  : volume de la solution d'HCl utilisé pour la détermination (ml)

m: masse de la prise d'essai (grammes)

**Mesure de l'Indice d'Acide :**

L'indice d'acide noté I.A est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle.

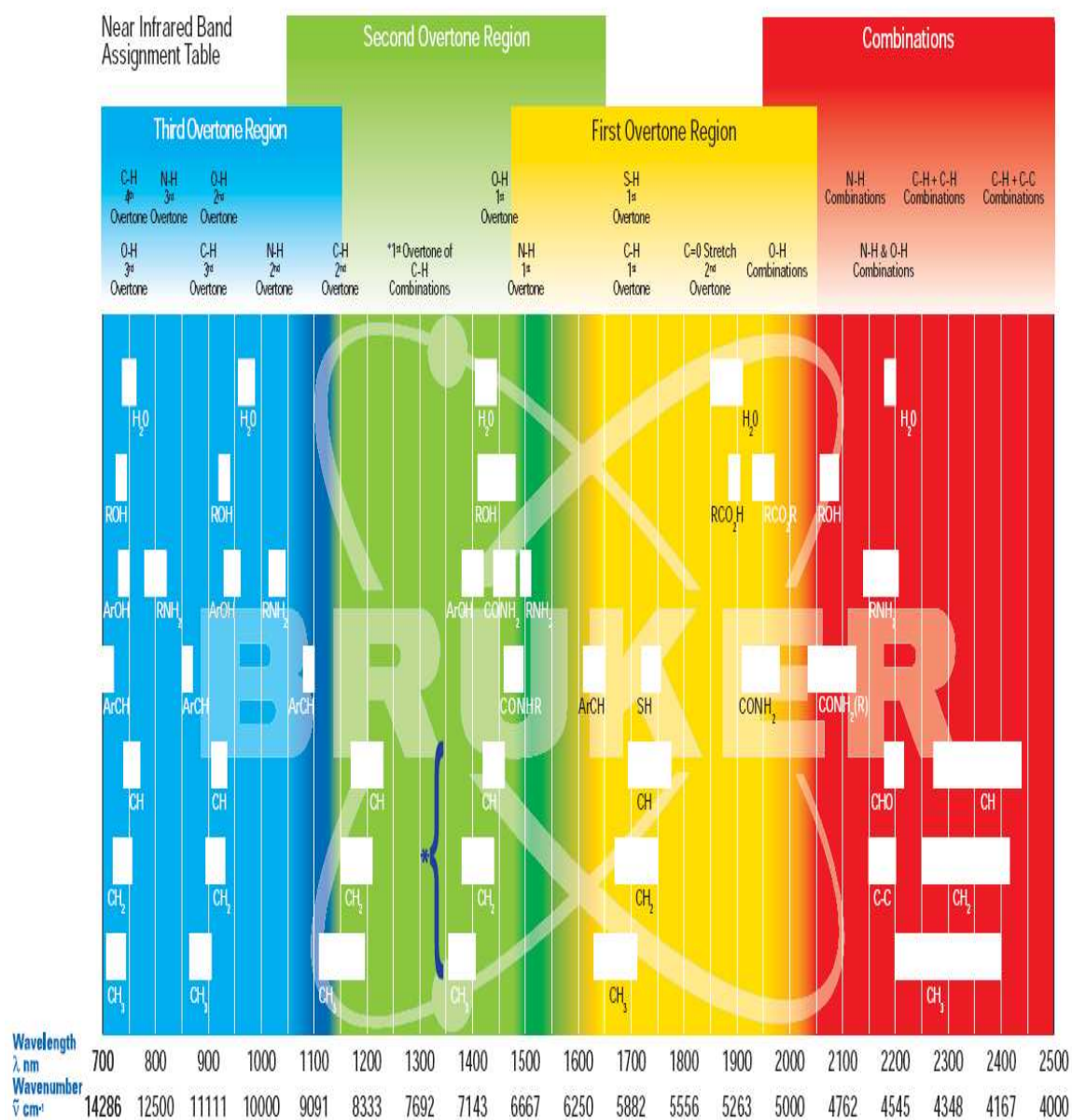
$$IA = 5,61 \times \left[ \frac{V}{m} \right]$$

Où :

V : volume de la solution de KOH utilisée (en ml)

m: prise d'essai (en g)

## ANNEXE N° 08: ZONE D'ABSORPTION DANS LE PROCHE INFRA ROUGE



## ANNEXE N° 09: EXEMPLE DE FICHE D'OBSERVATION DES BOUTURES

	Arbre 26								Arbre 29								
	Rameaux adultes				Jeunes rameaux				Rameaux adultes				Jeunes rameaux				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	-	-			-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-
2			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		-	-			-	-	-	-		-	-	-	-		-	-
4	-	-	-			*	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
5		-	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
7	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-					-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
10			-	-	-	-	-	*		-		-	-	-	-	-	-

	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20	S22	S24	S26	S28	S30	S32	S34
A26	33														
A29	24														

- : maty  
b : bourgeon  
\* : feuille mi-verte  
: velona

S : semaine  
A: arbre

## ANNEXE N° 10: LISTE DES ECHANTILLONS « FEUILLES »

NUMEROS	CODE	OBSERVATION
151	A20	Ampasina Décembre 2007 Feuille
152	A21	Ampasina Décembre 2007 Feuille
153	A23	Ampasina Décembre 2007 Feuille
154	A24	Ampasina Décembre 2007 Feuille
155	A25	Ampasina Décembre 2007 Feuille
156	A26	Ampasina Décembre 2007 Feuille
157	A25*	Ampasina Décembre 2007 Feuille
158	A27	Ampasina Décembre 2007 Feuille
159	A29	Ampasina Décembre 2007 Feuille
160	A30	Ampasina Décembre 2007 Feuille
161	Be X	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
162	Be R1	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
163	BeR2	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
164	BeR3	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
165	BeR4	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
166	MA40	Morarano Janvier 2008 Feuille
167	MA41	Morarano Janvier 2008 Feuille
168	Mrj2	Morarano Janvier 2008 Feuille
169	BMXrj3	Bemanja Janvier 2008 Feuille
170	BMXrg2	Bemanja Janvier 2008 Feuille
171	Mrj1	Morarano Janvier 2008 Feuille
172	BSXrj2	Besakay Janvier 2008 Feuille
173	BMXrj2	Bemanja Janvier 2008 Feuille
174	BSXrj1	Besakay Janvier 2008 Feuille
175	BMXrj1	Bemanja Janvier 2008 Feuille
176	AXrj4	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
177	BMXrg1	Bemanja Janvier 2008 Feuille
178	AXrj3	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
179	AXrj1	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
180	AXrj2	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
181	AXrj5	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
182	BSXrg1	Besakay Janvier 2008 Feuille

## ANNEXEN ° 11: LISTE DES ECHANTILLONS « HUILES »

NUMEROS	CODE	OBSERVATION
<i>RAVENSARA AROMATICA</i>		
161	Be X	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
162	Be R1	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
163	BeR2	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
164	BeR3	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
165	BeR4	Betanimainty Décembre 2007 Feuille
166	MA40	Morarano Janvier 2008 Feuille
167	MA41	Morarano Janvier 2008 Feuille
168	Mrj2	Morarano Janvier 2008 Feuille
169	BMXrj3	Bemanja Janvier 2008 Feuille
170	BMXrg2	Bemanja Janvier 2008 Feuille
171	Mrj1	Morarano Janvier 2008 Feuille
172	BSXrj2	Besakay Janvier 2008 Feuille
173	BMXrj2	Bemanja Janvier 2008 Feuille
174	BSXrj1	Besakay Janvier 2008 Feuille
175	BMXrj1	Bemanja Janvier 2008 Feuille
176	AXrj4	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
177	BMXrg1	Bemanja Janvier 2008 Feuille
178	AXrj3	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
179	AXrj1	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
180	AXrj2	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
181	AXrj5	Amparihibe Janvier 2008 Feuille
182	BSXrg1	Besakay Janvier 2008 Feuille
183	Mrg	Morarano Janvier 2008 Graine

## ANNEXE N° 12 : RESULTATS GENERAUX DU TEST OLFACTIF

	FEUILLES		HUILES	
Nombre du testeur	05		05	
Présence d'annis	+	-	+	-
Code				
151	4	1		
152	2	3		
153	1	4		
154	0	5		
155	2	3		
156	0	5		
157	4	1		
158	3	2		
Nombre du testeur	06		06	
159	3	3		
160	2	4		
161	1	5	1	5
162	5	0	4	2
163	0	6	1	5
164	0	6	2	4
165	4	2	1	5
166	5	1	3	3
167	5	1	6	0
168	6	0	5	1
169	3	3	3	3
170	4	2	4	2
171	6	0	4	2
172	1	5	1	5
173	2	4	1	5
174	0	6	0	6
175	3	3	3	4
176	1	5	2	4
177	2	4	1	5
178	1	5	2	4
179	0	6	0	6
180	5	1	3	3
181	1	5	1	5
182	1	5	1	5
183	6	0	5	1





## ANNEXE N° 13: STATISTIQUE SIMPLE DE L'ACP

Variable	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données manquantes	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
a_Pinène	19	0	19	0.000	7.300	1.132	1.742
Sabinène	19	0	19	0.000	28.900	5.099	7.064
a_terpinène	19	0	19	0.000	35.600	1.968	8.147
d_"carène	19	0	19	0.000	31.000	2.453	7.514
limonène	19	0	19	0.000	34.700	4.979	8.327
g-terpinène	19	0	19	0.000	7.200	0.721	1.654
linalool	19	0	19	0.000	10.200	1.632	2.786
Terpinène- 4ol	19	0	19	0.000	4.800	1.426	1.556
M chavicol	19	0	19	0.000	95.000	16.498	32.668
M eugenol	19	0	19	0.000	95.400	42.916	39.577
(E)-β- Caryophyl	19	0	19	0.000	11.100	2.658	3.556
Germacrene D	19	0	19	0.000	17.200	2.416	4.432

**Titre: « ETUDE DES EFFETS DE TRAITEMENT SYLVICOLE  
SUR L'EVOLUTION DES CHEMOTYPES D'HUILE ESSENTIELLE DE RAVENSARA  
AROMATICA DES FORETS DANS LE CORRIDOR ZAHAMENA-MANTADIA »**

**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO**

Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques

Tél. : 228 67 – BP : 175-CP : 101

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES  
DIPLOME D'INGENIEUR**

**AGRONOME**

Option : **INDUSTRIES AGRICOLES ET  
ALIMENTAIRES**



Auteur : **Diamondra F. T. RAMIANDRISOA**  
**Promotion ILO (2002 – 2008)**

**DATE DE SOUTENANCE : 05 / 05 / 08**

**TUTEUR : P<sup>r</sup> Panja RAMANOELINA**  
Enseignant chercheur et  
Directeur de l'ESSA

## RESUME

Des traitements sylvicoles (recépage, bouturage et germination) ont été appliqués sur des plants de *Ravensara aromatica* Sonnerat, espèce endémique de la région humide de l'Est de Madagascar en vue de l'étude de l'évolution des chémotypes, plus particulièrement la variation de la composition chimique des huiles essentielles d'une génération à l'autre.

Les rameaux fournissant environ 708 boutures et une vingtaine d'échantillons de feuilles pour la distillation ont été prélevés sur terrain, dans cinq sites potentiels différents (Didy, Anosibe an'Ala, Morarano, Ampasina-Betanimainty, Raboana).

D'après les analyses au laboratoire, la teneur en huile essentielle, l'indice de réfraction, la densité sont variables du pied-mère au rejet ou aux régénérations.

Les huiles obtenues par hydrodistillation sont ensuite analysées par CPG dans les mêmes conditions que les huiles de feuilles issues d'arbres ou de rejet de souche pour permettre la comparaison et l'interprétation des résultats.

Dans les forêts de Morarano, Bemanja et Besakay, les pourcentages des constituants bien représentés diminuent du pied-mère au rejet ou régénérations. Mais il apparaît que le type chimique de l'huile essentielle est toujours stable.

Dans le cas du bouturage qui a fourni des feuilles en quantité très restreinte (petites feuilles peu nombreuses), l'analyse par la méthode NIRS a été le seul recours.

Le traitement statistique des résultats d'analyses chromatographiques par l'ACP a conduit à caractériser trois groupes d'huile essentielle.

- le premier groupe est formé par des échantillons riches en méthyl eugenol (63,9% à 95,4%)
- le deuxième groupe est composé par les individus riches en monoterpènes (10% à 34,7%)
- le troisième groupe est constitué par les individus riches en méthyl chavicol (85,3% à 95%)

Les analyses par CHA visualisent les groupes obtenus par l'ACP tandis que l'AFD améliore la présentation de l'image et confirme les résultats obtenus par l'ACP.

La méthode d'analyse spectroscopique proche infra rouge a permis de regrouper les feuilles dans les trois classes chimiques préétablies.

Mots clés : *Ravensara aromatica* Sonnerat ; Evolution ; Chémotype ; Huile essentielle ; Traitement sylvicole.