



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES



Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie et Ecologie Végétales
Option : Physiologie Végétale



**INFLUENCE DE L'AGE DE LA FEUILLE ET DE LA PLANTE SUR
LE RENDEMENT ET LA QUALITE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE
RAVINTSARA (*Cinnamomum camphora* L.)**

Présenté par : Faramalala RASENDRAMIADANA
(Maître-ès Sciences)

Soutenu publiquement le: 23 Juin 2009

Devant la commission d'examen composée de :

Président : Pr RAMAVOVOLOLONA

Rapporteur : Dr Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA

Examineurs : Dr Eliane RALAMBOFETRA

Dr Voahangy RAMANANDRAIBE

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES

Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie et Ecologie Végétales
Option : Physiologie Végétale

**INFLUENCE DE L'AGE DE LA FEUILLE ET DE LA PLANTE SUR
LE RENDEMENT ET LA QUALITE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE
RAVINTSARA (*Cinnamomum camphora* L.)**

Présenté par : Faramalala RASENDRAMIADANA
(Maître-ès Sciences)

Soutenu publiquement le 23 Juin 2009

Devant la commission d'examen composée de :

Président : Pr RAMAVOVOLOLONA
Rapporteur : Dr Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA
Examineurs : Dr Eliane RALAMBOFETRA
Dr Voahangy RAMANANDRAIBE

REMERCIEMENTS

Il nous est agréable de trouver ici l'occasion d'exprimer notre sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Nous voudrions exprimer nos vifs remerciements :

★ *A Dieu créateur qui, par son aide incomparable et sa haute bienveillance, nous a accordée la possibilité d'accomplir ce travail et d'arriver à terme ;*

★ *Au Professeur RAMAVOVOLOLONA, Enseignant Chercheur, responsable du 3^{ème} cycle en Physiologie Végétale et responsable de la formation doctorale du Département de Biologie et Ecologie Végétales à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, qui malgré ses obligations professionnelles a accepté de présider notre soutenance et a corrigé rapidement ce mémoire.*

★ *Au Docteur Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA, Maître de Conférences au Département Biologie et Ecologie Végétales à la Faculté des Sciences, mon encadreur, qui a eu l'amabilité de guider et diriger mon travail, vos conseils inestimables ont facilité l'élaboration de ce document et malgré vos obligations vous avez consacré un temps considérable pour sa correction.*

★ *Au Docteur Eliane RALAMBOFETRA, Maître de Conférences au Département Biologie et Ecologie Végétales à la Faculté des Sciences, qui malgré ses nombreuses occupations a bien voulu accepter d'examiner ce travail.*

★ *Au Docteur Voahangy RAMANANDRAIBE, Maître de Conférences au Département Chimie organique de la Faculté des Sciences, qui malgré ses nombreuses occupations a bien voulu accepter d'examiner ce travail.*

★ *Au Professeur Suzanne URVERG-RATSIMAMANGA, Présidente de l'IMRA, qui a bien voulu accorder ma demande de stage au sein de son Institut, en vue de la préparation du Diplôme d'Etudes Approfondies ;*

★ *A Monsieur Delphin Justin RABEHAJA, Responsable au sein du Laboratoire d'Analyse des Huiles Essentielles de l'IMRA, mon encadreur technique, ainsi qu'à son assistant Harilala IHANDRIARISON, qui ont eu la gentillesse de m'accueillir dans leur laboratoire pour effectuer les analyses de mes échantillons d'huiles essentielles.*

★ *A toute l'équipe de l'IMRA, surtout l'équipe de l'Unité de Recherche sur la Récolte et les Traitements Post-Récoltes, pour leur esprit de solidarité et d'entraide.*

★ *A tous les enseignants du Département de Biologie et Ecologie Végétales de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, pour la formation au cours de ces années d'études.*

★ *A toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire*

★ *A toute ma famille pour leur appui ENORME.*

TABLE DE MATIERES

REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES	iv
LISTES DES ABREVIATIONS ET GLOSSAIRE	vii
LISTES DES ANNEXES	viii
LISTES DES FIGURES	x
LISTES DES TABLEAUX	xi
INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
 I CINNAMOMUM CAMPHORA (RAVINTSARA)	 4
I.1 Botanique	4
I.1.1 Systématique	4
I.1.2 Morphologie	4
I.2 Distribution géographique	5
I.3 Biologie	5
I.4 Utilisations	6
 II LES HUILES ESSENTIELLES	 7
I.1 Définitions	7
I.2 Propriétés générales	7
I.3 Biosynthèse	8
1.3.1 Localisation	8
1.3.2 Synthèse	9
I.4 Composition chimique	9
I.5 Techniques d'extraction	10
I.5.1 Entraînement à la vapeur	11
I.5.2 Enfleurage et expression	11
I.5.3 Extraction par solvant	11
I.6 L'huile essentielle de <i>Cinnamomum camphora</i>	12
I.6.1 Confusion entre <i>Cinnamomum camphora</i> et <i>Ravensara aromatica</i>	12

1.6.2 Caractéristique	12
1.6.3 Composition chimique	13
1.6.4 Caractères physico-chimiques	13
1.6.5 Propriétés pharmacologiques	14
1.7 Huiles essentielles et normes	15
III LES FACTEURS AFFECTANT LA BIOSYNTHESE DES HUILES ESSENTIELLES	16
III.1 Facteurs climatiques	16
III.1.1 Quantité d'eau	16
III.1.2 Photopériodisme	16
III.1.3 Température	17
III.2 Facteurs pédologiques	17
III.3 Facteurs biotiques et anthropiques	17
III.3.1 Pathogènes	17
III.3.2 Fréquence des récoltes	17
III.4 Facteurs physiologiques	18
III.4.1 Age chronologique de la plante	18
III.4.2 Cycle phénologique de la plante	18
III.4.3 Stade ontogénique de la feuille	18
III.5 Paramètres de la distillation	19
III.5.1 Méthode utilisée	19
III.5.2 Durée de la distillation	19
MATERIELS ET METHODES	20
I MATERIEL VEGETAL	21
I.1 Age ontogénique de la feuille	21
I.2 Age chronologique de la plante	23
I.3 Saison de récolte	23
I.4 Cycle phénologique	23

II METHODES	24
II.1 Collecte du matériel végétal	24
II.2 Extraction de l'huile essentielle	24
II.3 Détermination de la composition chimique	26
II.3.1 Analyse de l'huile essentielle	26
II.3.2 Identification des pics	29
II.4 Analyses des données	30
RESULTATS	31
I VARIATION DU RENDEMENT EN HUILE ESSENTIELLE DE RAVINTSARA EN FONCTION DES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES	32
I.1 Rendement et âge ontogénique des feuilles	32
I.2 Rendement et âge chronologique de la plante	32
I.3 Rendement et proportion des différents stades de développement des feuilles	32
I.4 Rendement et phénologie de la plante	35
II VARIATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE RAVINTSARA EN FONCTION DES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES	37
II.1 Composition chimique et âge ontogénique des feuilles	37
II.2 Composition chimique et âge chronologique de la plante	40
II.3 Composition chimique et saison	44
II.4 Composition chimique et phénologie de la plante	52
DISCUSSION	58
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
WEBIOGRAPHIE	74
ANNEXES	I
RESUME	VII
SUMMARY	VIII

LISTES DES ABREVIATIONS ET GLOSSAIRE

IMRA	: Institut Malgache de Recherches Appliquées
LAHE	: Laboratoire d'Analyse des Huiles Essentielles
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
DIF	: Détecteur à Ionisation de Flamme
SM	: Spectrométrie de Masse
FTIR	: Transformée de Fourier en Spectrométrie InfraRouge
EMAG	: Ester Méthylique d'Acide Gras
ANOVA	: Analyse Of Variance
LSD	: Least Significant Difference
ISO	: Organisation Internationale de Standardisation
EOA	: Essential Oil Association
AFNOR	: Association Française de la Normalisation
tr/s	: tour par seconde

Génotype : individu provenant d'une graine ayant une base génétique donnée.

Cycle phénologique : alternance des différentes phases de développement de la plante : la feuillaison, la floraison, la fructification et la chute des feuilles.

Age chronologique : âge de l'individu depuis la germination.

Age ontogénique : âge d'un organe (tige, feuille ou racine) depuis son initiation

LISTES DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Hydrodistillation	I
ANNEXE 2 : Chromatographie en phase gazeuse	II
ANNEXE 3 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara extraite d'individus jeunes (≤ 15 ans) suivant la phénologie	III
ANNEXE 4 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara extraite d'individus matures (30 ans) suivant la phénologie	IV
ANNEXE 5 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara extraite d'individus vieux (≥ 60 ans) suivant la phénologie	V
ANNEXE 6 : Structure des constituants chimiques	VI

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Un pied <i>C. canphora</i> âgé de 15 ans sur le site d'Ivato près d'Antananarivo	5
Figure 2 : Planche botanique du <i>C. canphora</i>	6
Figure 3 : Diagramme simplifié montrant la voie de biosynthèse des composants des huiles essentielles chez les plantes	10
Figure 4 : Les différents stades de développement des feuilles de <i>C. canphora</i>	22
Figure 5 : Cocotte minute transformée en extracteur d'huile essentielle	25
Figure 6 : Appareil de distillation type Clevenger	25
Figure 7 : Diagramme simplifié du principe de la chromatographie en phase gazeuse	27
Figure 8 : CPG/DIF GC 8000 TOP avec injection automatique AS 800	28
Figure 9 : Variation du rendement en huile essentielle suivant les stades de développement des feuilles de ravintsara	33
Figure 10 : Variation du rendement annuel en huile essentielle de ravintsara en fonction de l'âge chronologique de la plante	33
Figure 11 : Variation mensuelle du rendement en l'huile essentielle obtenu à partir d'un lot de feuilles constitué des différents stades de développement dans leurs proportions naturelles au moment de la récolte	34
Figure 12 : Evolution des proportions des différents stades de feuilles de ravintsara au cours de l'année	34
Figure 13 : Evolution du rendement en huile essentielle de ravintsara au cours du cycle phénologique d'individus adultes (30 et 60 ans)	36
Figure 14 : Evolution du rendement en huile essentielle de ravintsara au cours du cycle phénologique d'individus jeunes (5 et 15 ans)	36
Figure 15 : Variation des monoterpènes, sesquiterpènes, produits oxygénés et composés non identifiés suivant l'âge de l'individu	41
Figure 16 : Variation des principaux constituants des monoterpènes suivant l'âge de l'individu	41
Figure 17 : Variation des principaux constituants des produits oxygénés suivant l'âge de l'individu	42
Figure 18 : Variation annuelle de la teneur en monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux	47

Figure 19 : Variation annuelle de la teneur en produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux	47
Figure 20 : Variation annuelle de la teneur en sesquiterpènes de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux	51
Figure 21 : Variation annuelle de la teneur en composés non identifiés de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des individus de ravintsara identifiés pour l'analyse des huiles essentielles extraites de feuilles	21
Tableau 2 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara suivant le stade de développement de la feuille	38
Tableau 3 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara suivant l'âge de l'individu	43
Tableau 4 : Variation mensuelle de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle commerciale de ravintsara	45
Tableau 5 : Variation mensuelle de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle expérimentale de ravintsara	48
Tableau 6 : Variation de la teneur en monoterpènes, produits oxygénés, sesquiterpènes et composés non identifiés suivant la phénologie d'individus jeunes (5 et 15 ans)	52
Tableau 7 : Variation de la teneur en monoterpènes, produits oxygénés, sesquiterpènes et composés non identifiés suivant la phénologie d'individus adultes (30 ans)	53
Tableau 8 : Variation des principaux constituants des monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus jeunes	53
Tableau 9 : Variation des principaux constituants des monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus adultes (30 ans)	54
Tableau 10 : Variation de la teneur en monoterpènes, produits oxygénés, sesquiterpènes et composés non identifiés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus vieux (60 ans)	54
Tableau 11 : Variation de la teneur des principaux constituants des monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus vieux (60 ans)	55
Tableau 12 : Variation de la teneur des principaux constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus jeunes (5 et 15 ans)	55
Tableau 13 : Variation de la teneur des principaux constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus adultes (30 ans)	56
Tableau 14 : Variation de la teneur des constituants majoritaires des produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus vieux (60 ans)	57

INTRODUCTION

Parmi les 13 000 espèces végétales recensées à Madagascar, 110 sont aromatiques, réparties dans 33 familles botaniques, dont 58 espèces sont endémiques, et 52 introduites (Koechlin et al., 1974; Rakotovao, 1996 ; Berha et al., 2005). Actuellement, environ 71 espèces aromatiques sont exploitées, dont 41 introduites et 30 endémiques (Andrianaivoravelona, 2007).

Dans le contexte de la mondialisation de l'économie, la grande île doit diversifier davantage ses produits d'exportation issus de l'agriculture. L'exploitation des plantes aromatiques et médicinales tient une place grandissante parmi les nouvelles activités agricoles.

Actuellement, Madagascar propose sur le marché une vingtaine d'huiles essentielles provenant d'espèces différentes (Ranarivelo et al., 1997 ; Andrianoelisoa, 2008). Environ 30 000 kg/an d'huiles essentielles sont exportées qui sont dominées par le girofle (*Eugenia caryophyllata*), le niaouli (*Melaleuca leucodendron*), l'ylang-ylang (*Cananga odorata*), le ravintsara (*Cinnamomum camphora*), le havozo (*Ravensara aromatica*), le katrafay (*Cedrelopsis grevei*), le mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans*) et la cannelle (*Cinnamomum zeynilacum*).

L'huile de ravintsara est l'une des huiles essentielles les plus recherchées sur le marché mondial. Cet arbre est introduit à Madagascar au milieu du 19^{ème} siècle en tant que plante ornementale ; il est planté dans toute l'île à cause de sa vertu aromatique. L'huile de ravintsara se distingue des huiles essentielles de *Cinnamomum camphora* de provenance asiatique par l'absence de camphre et par sa richesse en 1,8-cinéole (Bailey et Bailey, 1976 ; Randevoson, 2004).

Grâce à ses caractéristiques chimiques, l'huile essentielle de ravintsara présente des propriétés thérapeutiques exploitées dans le domaine médical et en aromathérapie surtout comme anti-inflammatoire et antiseptique. C'est pourquoi, la demande est, actuellement, en forte croissance. Or, le commerce des huiles essentielles exige des normes de qualité strictes. A titre d'exemple, l'huile de ravintsara doit être sans camphre, riche en 1,8-cinéole (>58%), en sabinène (12 à 17%), en terpinène-4-ol (2 à 3%) et en α -terpinéol (5 à 10%). Ce qui demande un contrôle de qualité à tous les niveaux de la production.

Sur le marché local, l'huile de ravintsara coûte autour de 180.000 Ariary/kg (Rabehaja, communication personnelle). Au niveau des ventes en ligne sur internet, un flacon de 15ml certifiée bio coûte autour de 9,50 €, chez Sanoflore®.

Environ 2500 kg/an d'huiles de ravintsara sont exportées, c'est-à-dire 8,7% des huiles exportées. Du fait de la surexploitation des feuilles de ravintsara et de la production toujours artisanale de cette huile, la quantité exportée amorce une baisse significative de 3342 à 1765kg entre 2004 et 2007 (Direction de la Valorisation des Ressources Naturelles). En outre, les données concernant le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara publiés dans les travaux antérieurs sont très hétérogènes pour servir d'outil d'aide à la décision. Ces variations pourraient être causées par des facteurs liés à la physiologie de la plante, à la qualité du matériel végétal, aux modalités opératoires lors de la distillation et/ou à l'origine géographique (Lowana, 1998 ; Rangahau, 2001).

L'huile de ravintsara exportée provient à la fois d'individus âgés de plus de 50 ans et de jeunes plantations mises en place, suite à l'engouement des opérateurs pour ce secteur depuis une dizaine d'années.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet des facteurs physiologiques, en particulier l'âge des individus sur la production d'huile essentielle de ravintsara dans le but d'obtenir une huile essentielle de bonne qualité et d'orienter la production en fonction des besoins du marché. Pour ce faire, les variations du rendement et de la composition chimique en fonction de (1) l'âge chronologique, (2) l'âge ontogénique des feuilles, (3) la saison et (4) la phénologie de la plante seront étudiées. A terme, une fiche technique sera proposée aux producteurs pour une bonne pratique des récoltes de feuilles de ravintsara.

GENERALITES

I *Cinnamomum camphora* (RAVINTSARA)

Introduite à Madagascar et aux îles Mascareignes au milieu du 19^{ème} siècle, *Cinnamomum camphora* ou ravintsara est une plante originaire de Taiwan et du Japon. (Ranarivelo, 2006).

I.1 Botanique

I.1.1 Systématique

Règne	: Végétale
Embranchement	: Spermaphyte
Sous-embranchement	: Angiosperme
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Magnoliidae
Ordre	: Laurale
Famille	: Lauraceae
Genre	: <i>Cinnamomum</i>
Espèce	: <i>camphora</i>
Nom d’auteur	: Linné (Née & Ebern)
Synonyme	: <i>Camphora Camphora</i> , <i>Laurus camphora</i>
Noms vernaculaires	: Ravintsara, Kamifaoro (Merina, Betsileo), Ravinsara (Tanosy)

I.1.2 Morphologie

Cinnamomum camphora est un arbre de grande taille pouvant atteindre 15 à 20 m de haut, doté d’un tronc vigoureux, entouré d’une écorce rugueuse et crevassée avec l’âge (Figure 1). Son bourgeon terminal est assez large et de forme conique (Randevoison, 2004). Les feuilles sont ovales, alternées, coriaces, larges et longues, insérées en hélices. Elles sont reliées aux tiges par des pétioles longs de 3 à 5 cm. Le limbe est densément réticulé sur les deux faces ou lisse dessus, à base aiguë ou atténuée cunéiforme, acuminée au sommet, et à acumen aigu membraneux, elliptique et avec une longueur de 5 à 10 cm et 3,5 à 5 cm de large.

Les nervures principales et secondaires ont un aspect assez proéminent et présentent des domaties. Les couleurs sont verte claire brillante sur la face supérieure et bleu-verte sur la face inférieure, rougissant avant tombée (Wagner et al., 1999).

L'inflorescence est en panicule axillaire, plus courte que les feuilles, glabre, longue, velue et à pédicelle court. Les fleurs sont nombreuses, hermaphrodites, petites, de couleur jaune ou blanc verdâtre, glabre groupées en panicules axillaires (Figure 2). Elles sont formées de périanthe à tube court, conique, velu en dedans, à poils brunâtres, à gynécée unicarpellé de 6 lobes et 9 étamines (Stubbs et al., 2001). Les fruits sont globulaires, sphériques, un peu charnus, de couleur noire lisse, pourpre ou violacée à maturité ressemblant à de petites baies (Wagner et al., 1999).



Figure 1 : Un pied de *Cinnamomum camphora* âgé de 15 ans sur le site d'Ivato près d'Antananarivo

I.2 Distribution géographique

Cinnamomum camphora s'est adapté facilement aux diverses conditions climatiques et écologiques de la grande île. On le rencontre dans les zones de moyenne et de basse altitude comme les hauts-plateaux aux environs d'Antananarivo, la région du Vakinakaratra (Antsirabe, Betafo, etc.), la partie Sud-Est (Tolagnaro et Farafangana). On peut le trouver aussi dans les autres régions (Moramanga, Anjiro, Fianarantsoa, Ambositra) et même sur les régions côtières (Randevoison, 2004).

I.3 Biologie

La croissance de cet arbre exige, en général, une pluviométrie comprise entre 1520 et 2540 mm/an (Juvik et Juvik, 1998).

Dans les pays d'origine, la période de floraison de *Cinnamomum camphora* se déroule entre les mois d'Avril et Juin.

Les fruits atteignent leur maturité au mois de Septembre. A Madagascar, *Cinnamomum camphora* fleurit entre les mois d'Octobre et Novembre et fructifie d'Avril à Mai.

Un arbre de *Cinnamomum camphora* peut produire environ 1000 graines par an (Pelier, 2002). Pour la régénération naturelle, les graines sont dispersées par les oiseaux ou par l'eau mais on ne trouve pas très souvent de jeunes plants autour de la plante mère (Ramamonjisoa, 2004). Selon Weiss (1997), *Cinnamomum camphora* peut pousser sur différents types de sol, mais la croissance est meilleure sur un sol sablo-argileux.

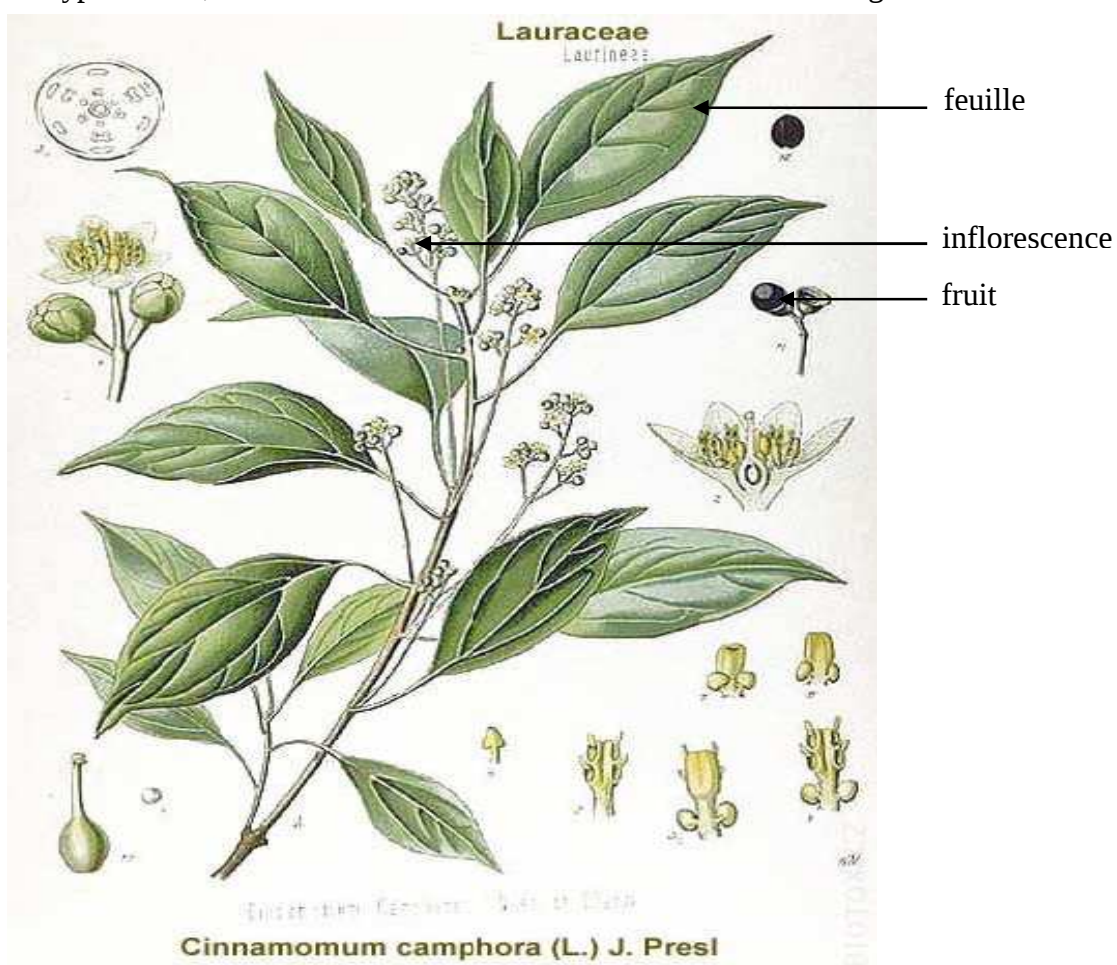


Figure 2 : Planche botanique du *Cinnamomum camphora* (Source : <http://plants.usda.gov>)

1.4 Utilisations du *Cinnamomum camphora*

Le ravintsara est surtout exploité à des fins médicales. Ses feuilles sont utilisées pour traiter les infections des voies respiratoires comme la grippe, contre les maux de tête et aussi comme antispasmodiques et antifongiques.

Mélangée avec d'autres produits tels que les feuilles d'*Aphloia theiformis* (ravimboafotsy), la plante est utilisée pour soigner le rachitisme chez les enfants malingres. Le bois est utilisé pour l'obtention de matières volatiles qui ont des propriétés antimitoses. L'écorce est employée comme antiseptique contre les maladies de la peau. La résine agit contre les maux de tête, les douleurs de dents et apaise la fièvre (Raoelimanana, 1996; Randevoson, 2004).

II LES HUILES ESSENTIELLES

II.1 Définitions

➤ Huiles essentielles

Les huiles essentielles ou essences aromatiques végétales sont des substances chimiques odorantes et volatiles, extraites à partir de diverses parties de la plante. Elles sont faiblement colorées, à densité faible généralement, liquides à température ambiante, totalement solubles dans l'alcool, l'éther et dans les huiles végétales mais insolubles dans l'eau. Une huile essentielle se distingue des autres huiles par ses caractéristiques organoleptiques (couleur, aspect, odeur), ses propriétés physico-chimiques (densité relative, indice de réfraction, miscibilité à l'alcool, pouvoir rotatoire, indice d'acide, indice d'ester) et sa composition chimique très complexe.

➤ Chémotype

C'est le mot dérivé de « chimio-type » qui signifie tout simplement « type chimique ». Ce sont des composés chimiques dont la teneur relative permet de distinguer les huiles essentielles extraites de différentes plantes (Penoel et al., 2001).

II.2 Propriétés générales des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. La variabilité des constituants des huiles essentielles ainsi que leurs proportions relatives induisent de nombreux effets curatifs (Tuberoso et al., 2006).

Les huiles essentielles sont principalement utilisées comme anti-infectieuses (antivirale, antibactérienne, antifongique, antiparasitaire) (Farreyrol, 1997; Baricevic et al., 2001). Selon leurs composants spécifiques, elles ont des propriétés rééquilibrantes, tonifiantes, endocrino-régulatrices, cardio-circulatoires, immunostimulantes, digestives, (Penoel et al., 2001 ; Konnings et al., 2004).

Les huiles essentielles sont très utilisées dans l'industrie cosmétique et dans la parfumerie où elles sont considérées comme des éléments de bases telles que les huiles essentielles de l'ylang-ylang, du jasmin, de basilic, de palmarosa et de lemon grass (Andrianaivoravelona, 2007).

Elles sont aussi utilisées comme exhausteurs de goût dans les industries agro-alimentaires comme les essences de poivre, de gingembre, de menthe, de girofle et de citrus (Ohno et al., 2003; De Laurentis et al., 2005).

Les huiles essentielles participent à la défense de la plante contre les insectes ravageurs par un effet anesthésique (Rangahau, 2001), contre les infections microbiennes grâce aux propriétés anti-fongiques, antivirales et anti-bactériennes et contre les herbivores par le goût adverse et l'effet sur le système nerveux (Rangahau, 2001; Kouninki et al., 2005).

Grâce à leur volatilité, les plantes les utilisent pour attirer les insectes pollinisateurs (Weiss, 1997 ; Rao, 2000). Les huiles essentielles interviennent, également, lors de la compétition entre les différentes espèces végétales (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines et de leur développement (Daizy et al., 2006; Domaracký et al., 2007; Andrianjafinandrasana, 2008).

II.3 Biosynthèse et accumulation

II.3.1 Localisation

La biosynthèse et l'accumulation des composants de l'huile essentielle, principalement les monoterpènes, sont spécifiquement localisées dans des structures sécrétrices particulières des différentes parties de la plante (Lange et al., 2007) telles que la feuille, l'écorce, la fleur, le fruit, le rhizome, la racine, le suc résineux et la graine (Gershenzon et al., 1992; Mc Caskill et al., 1999).

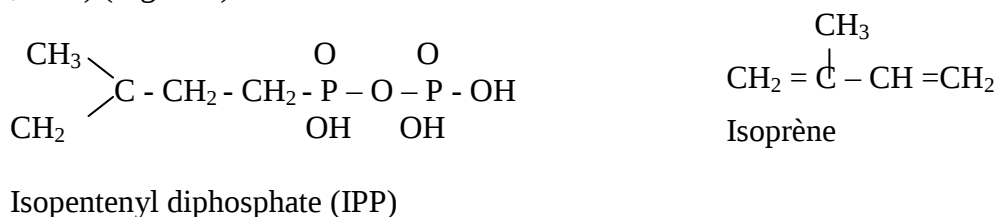
Les composés volatils sont sécrétés et accumulés dans les leucoplastes de certaines cellules sécrétrices des différents organes et/ou des structures glandulaires non photosynthétiques de la plante comme les poches sécrétrices des rhizomes, les cellules sécrétrices insérées dans l'assise épidermique ou à l'extrémité du poil, les trichomes, les glandes et les canaux résinifères (Turner et al., 1999; Gershenzon et al., 2000; Lange et al., 2007).

Les glandes sécrétrices sont des regroupements de cellules sous-épidermiques avec 12 cellules apicales, une cellule basale, une cellule péribasale et 12 à 18 cellules radiales (Morone-Fortunato et al., 2008; Bosabalidis, 2002).

II.3.2 Biosynthèse

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires. Leur biosynthèse (Figure 3) nécessite l'incorporation de métabolites primaires, surtout le saccharose, utilisés comme précurseurs et sources de groupements carbonés pour les monoterpènes (Gershenzon et al., 1993; Ranwala et al., 1998; Dubey et al., 2003). Le saccharose est aussi une source d'énergie et joue le rôle de cofacteur dans les réactions de la biosynthèse (Sturm, 1999). Chaque réaction de synthèse d'un composé monoterpénique nécessite une enzyme spécifique. Dans ce cas, la quantité du composé synthétisé est dépendante de la vitesse de l'activité enzymatique (Aloni et al., 1997; Ranwala et al., 1998).

La biosynthèse s'effectue par la voie du mévalonate, aboutissant à la formation d'isoprénol comme l'isopentényl diphosphate (Eisenreich et al., 1997 ; Sanger et al., 1998). Ce dernier est le précurseur des autres terpénoïdes conduisant ensuite à la formation des monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), di (C_{20}), tri (C_{30}) et tetraterpènes (C_{40}), en utilisant un multiple pair ou impair de l'unité isoprénique (C_5H_8) par l'isomérisation et en utilisant le diméthylallyl diphosphate (Lichtenthaler et al., 1997 ; Eisenreich et al., 1997 ; Mc Caskill et al., 1999) (Figure 4).



Les produits oxygénés et aromatiques sont formés par fonctionnalisation après isomérisation et cyclisation des pyrophosphates d'isopentenyl.

II.4 Composition chimique de l'huile essentielle

Une huile essentielle peut contenir 50 à 100 éléments biochimiques différents, parfois 300 comme chez la Lavande. Parmi ces constituants, deux types de composés constituent la presque majorité d'une huile essentielle:

➤ **Les hydrocarbures terpéniques**, regroupant les monoterpènes qui sont des hydrocarbures terpéniques à deux unités isoprènes ($2 \times C_5$), dont la masse moléculaire est, en général, égale à 136 ($C_{10}H_{16}$) et les sesquiterpènes qui sont des hydrocarbures à trois unités isoprènes ($3 \times C_5$) avec une masse moléculaire de 204 ($C_{15}H_{24}$).

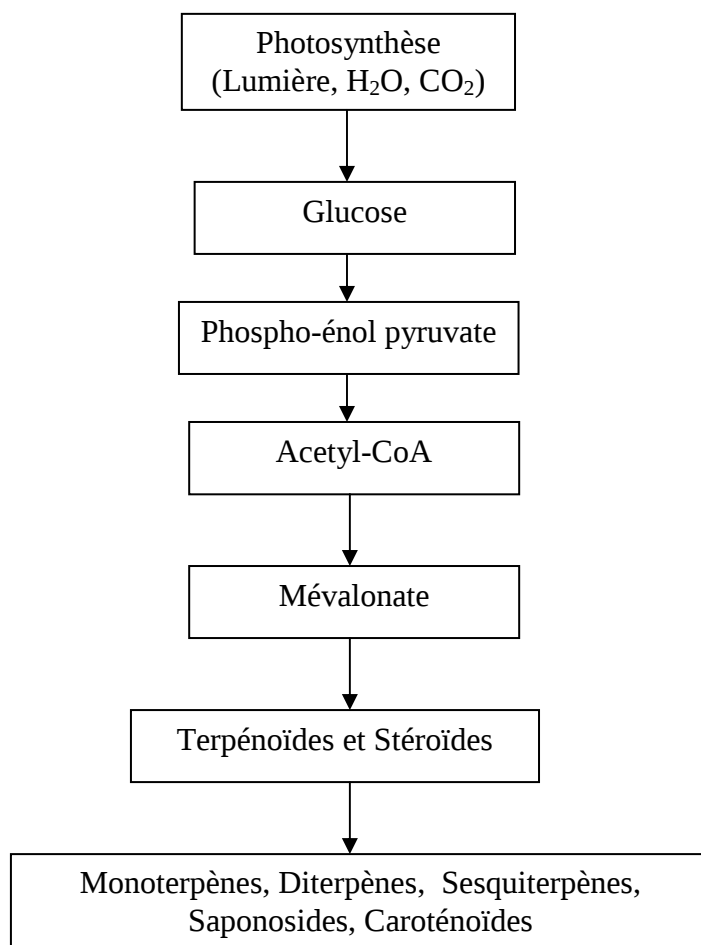


Figure 3 : Diagramme simplifié montrant la voie de biosynthèse des composants des huiles essentielles chez les plantes

➤ **Les produits oxygénés**, regroupant les monoterpénols ($C_{10}H_{28}O$) de masse moléculaire égale à 164, les sesquiterpénols ($C_{15}H_{26}O$) de masse moléculaire 222, les oxydes de sesquiterpénols, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les oxydes, les esters, etc (Farreyrol, 1997).

II.5 Techniques d'extraction des huiles essentielles

Plusieurs méthodes sont utilisées, actuellement, pour l'extraction des huiles essentielles dont les plus connues sont l'entraînement à la vapeur (hydrodistillation et hydrodiffusion), l'extraction par pression et par enfleurage, l'extraction par solvant. L'extraction par CO_2 supercritique et la distillation par micro-onde sont de nouvelles méthodes.

II.5.1 Entraînement à la vapeur

Cette méthode est la plus utilisée industriellement. Elle permet une extraction presque complète des substances aromatiques volatiles. En général, l'unité de distillation est composée d'un générateur de vapeur (chaudière ou un ensemble qui forme un bain marie), un alambic ou un ballon de distillation dans lequel les matières végétales sont placées, un condensateur ou réfrigérant et un vase florentin ou essencier.

➤ Hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode qui consiste à immerger directement le matériel végétal intact dans l'eau qui est portée à ébullition. Les constituants volatils des végétaux libérés par éclatement des cellules sont entraînés par la vapeur d'eau.

➤ Hydrodiffusion

Dans ce procédé, l'eau et la matière végétale sont séparées. C'est la vapeur d'eau fournie par une chaudière qui assure l'entraînement de l'huile sous l'action de la pression et de la température. Le mélange azéotropique est ensuite condensé à travers un refroidisseur. Dans la pratique, cette technique est rencontrée pour le cas de l'alambic, et elle est utilisée pour les huiles essentielles peu solubles dans l'eau.

II.5.2 Enfleurage et expression

Ce sont des procédés anciens réservés à quelques types de matériels comme les fleurs de jasmin, de rose et de violette.

➤ Enfleurage

Elle consiste à mettre le matériel végétal en contact direct avec des matières grasses d'origine animale, et permet d'obtenir des pommades ou des substances absolues très aromatiques.

➤ Expression

Cette technique est utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes de la famille des Rutacées (citron, orange, mandarine) qui consiste à briser mécaniquement (abrasion, compression, incision, perforation,...) les poches à essence (souvent au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau.

II.5.3 Extraction par solvant

Il s'agit d'extraire les substances aromatiques aux solvants volatils tels que, l'hexane, le dichlorométhane ou l'éthanol. Le solvant pénètre à travers les membranes cellulaires en faisant éclater les cellules.

Après évaporation des solvants, les substances grasses et très concentrées sont obtenues (oléorésines, concrètes et absolues). L'essence est récupérée après précipitation de ces graisses par extraction à l'éthanol à chaud.

II.6 L'huile essentielle de *Cinnamomum camphora*

II.6.1 Confusion entre *Cinnamomum camphora* et *Ravensara aromatica*

Une confusion persiste, depuis longtemps, entre *Cinnamomum camphora* et *Ravensara aromatica*. Mais, les études botaniques ont prouvé qu'elles sont tout à fait différentes, même si, systématiquement, elles appartiennent à la même famille des Lauracées. *Cinnamomum camphora* est une espèce d'origine asiatique tandis que *Ravensara aromatica* est une espèce endémique de Madagascar se trouvant principalement dans la partie Est de l'Ile. Cette confusion était à l'origine de problèmes de commercialisation. En effet, ces deux espèces sont souvent appelées ravintsara pour les non spécialistes.

Les importateurs commandent du « ravensara », or, en réalité, ils voulaient acheter de l'huile de ravintsara (Raharivelomanana, 19 88). Les scientifiques et les opérateurs désignent par ravintsara l'huile extraite de feuilles de *Cinnamomum camphora* à cinéole de Madagascar, ravensara celle de feuille de *Ravensara aromatica* et Havoza celle de l'écorce de *Ravensara aromatica*. Ces trois types d'huiles sont bien distinctes sur le marché des huiles essentielles (Weiss, 1997; Randevoson, 2004; Ranarivelo, 2006).

II.6.2 Caractéristiques

L'huile essentielle de *Cinnamomum camphora* est obtenue par hydrodistillation des feuilles, écorces ou racines de l'arbre.

L'origine de la plante (Asie, Australie ou Madagascar) et les parties des plantes utilisées (racine, feuille, écorce) sont les sources de variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora*.

Les huiles essentielles produites à partir de feuilles d'individus localisés dans les pays asiatiques (Japon, Chine, Taiwan) sont riches en camphre, qui est une cétone terpénique de formule chimique $C_6H_{16}O$, pouvant atteindre jusqu'à 50 % pour les arbres du Japon. C'est l'huile essentielle du vrai camphrier et appelée HO ou HO-SHO (Stubbs et al., 2001). Les feuilles de la variété rencontrée à Madagascar donnent une huile dépourvue de camphre et riche en 1,8-cinéole qui est un oxyde terpénique avec un taux de 67,6%.

L'absence de camphre dans l'huile essentielle de feuilles de *Cinnamomum camphora* malgache, appelée huile de ravintsara, pourrait avoir une origine épigénétique (climatique et édaphique) ou génétique (Ramamonjiarisoa, 2004).

Trois chémotypes bien distinctes ont été identifiés pour les huiles essentielles extraites de feuilles de *Cinnamomum camphora* :

- chémotype à camphre (Asie, Chine et Australie)
- chémotype à linalool (Asie)
- chémotype à cinéole (Australie, Madagascar).

II.6.3 Composition chimique

L'huile essentielle de ravintsara est composée majoritairement de produits oxygénés (69,03%), d'hydrocarbures monoterpéniques (27,63%), de sesquiterpènes (1,86%) et de composés non identifiés (1,38%).

➤ Les hydrocarbures monoterpéniques

Les monoterpènes sont constitués principalement par la sabinène (14,05%), par l' α -pinène (4,24%) et le β -pinène (3,19%). En plus de ces composés, d'autres hydrocarbures monoterpéniques tels que le β -myrcène, l' α -terpinène, le limonène, l' γ -terpinène, le β -phellandrène et le terpinolène sont aussi enregistrés mais à une teneur inférieure à 1,5%. Leur identification est facile du fait de leur simplicité structurale et de la présence dans les banques de données de composés possédant la même structure.

➤ Les produits oxygénés

Ce sont les constituants majoritaires de l'huile essentielle de ravintsara, principalement le 1,8-cinéole (57,73%), l' α -terpinéol (8,65%) et le terpinène-4-ol (2,11%). Le linalool, l'acétate de linalyle, l'acétate de terpényle, le cis-nérolidol, le caryophyllène oxyde, la trans-nérolidol et l'acétate de géranyl sont présents à des teneurs faibles (<1%).

➤ Les hydrocarbures sesquiterpéniques

La teneur en sesquiterpènes de l'huile essentielle de ravintsara est relativement faible. Les sesquiterpènes sont composés par le β -caryophyllène (0,45%), l' α -humulène (0,72%), le β -sélinène (0,21) et le β -cadinène (0,23%). L'identification de ces produits oxygénés s'avère plus difficile à cause de la complexité de leur structure.

II.6.4 Caractéristiques physico-chimiques

L'huile de ravintsara a une densité 0,900 à 0,915 (20°C), un indice de réfraction de 1,460 à 1,470 à 20°C, un pouvoir rotatoire de 25 à -10° à 20°C et un point éclair de + 50°C.

Ces trois indices physiques sont importants pour la commercialisation de l'huile parce qu'ils permettent de déceler les fraudes éventuelles et d'assurer la qualité des huiles essentielles sur le marché (Ranarivelo, 1997).

II.6.5 Propriétés pharmacologiques

L'huile essentielle des camphriers asiatiques, appelée HO-SHO grâce à la richesse en camphre, a de nombreux atouts. Le camphre possède des propriétés antiseptiques, désinfectantes et insecticides, en mélange avec d'autres produits. Le camphre peut être considéré comme un métabolite secondaire intervenant lors de l'interaction de la plante avec l'environnement, et participant à la défense de la plante contre les pathogènes.

L'utilisation de ravintsara en aromathérapie peut être effectuée par usage externe, ou interne (Tomboarisendra, 2005; Ranarivelo, 2006). En usage externe, l'huile essentielle de ravintsara permet une meilleure circulation du sang à la surface de l'épiderme. Polyvalent et puissant, le ravintsara est principalement reconnu pour ses propriétés anti-infectieuses, antivirales, antibactériennes, tonifiantes, immunostimulantes, énergisantes, anti-catarrhales et expectorantes.

Elle est aussi employée comme, anti-inflammatoire et utilisée contre l'insomnie, la dépression, et l'anxiété dans le cas d'anxiété et de troubles nerveux (Davis, 1999). Sa propriété anti-inflammatoire provient de sa richesse en 1,8-cinéole qui inhibe les médiateurs de l'inflammation (Leu Hyun et Kim, 2006).

Elle s'est révélée aussi comme un excellent relaxant physique et psychique, grâce à son contenu en terpènes, surtout le α -terpinéol, actif au niveau du système nerveux central contre la déficience immunitaire grave (Leonard, 2007). Son pouvoir immunostimulant (association de 1,8-cinéole et de α -terpinéol) la rend intéressante contre les infections virales de type grippe, zona et herpès labial et génital.

En usage interne, elle agit contre les maladies infectieuses des voies respiratoires et du tube digestif, contre les diarrhées et les bronchites. (Leonard, 2007).

L'huile de ravintsara est probablement l'un des plus puissants antiviraux naturels connus. Cette huile essentielle inhibe la formation d'acides nucléiques (ADN et ARN) de certains virus et la réplication virale.

Il est possible de diminuer l'incidence des infections nosocomiales dans un service hospitalier par fumigation avec l'huile de ravintsara (Blanchard, 2007).

L'huile essentielle de ravintsara est aussi décrite comme, anti-malarique, inhibitrice de cholestérol, abortif, expectorant, et insecticide (Sommerard, 2005). Enfin, l'abondance de superoxyde dismutase lui confère un rôle protecteur des cellules contre le stress oxydatif (Allorge, 2003).

II.7 Huiles essentielles et normes

La normalisation est l'ensemble des règles et techniques résultant de l'accord entre les producteurs et les clients/utilisateurs. Ainsi, il existe plusieurs normes qui peuvent être nationales ou internationales dont les plus connues sont la norme internationale ISO (Organisation Internationale de Standardisation), la norme américaine EOA (Essential Oil Association) et la norme française AFNOR (Association Française de Normalisation). Ces normes sont nécessaires pour pouvoir commercialiser des produits dont la qualité est régulière et standardisée. Le marché actuel attache une très grande importance à la qualité de l'huile essentielle utilisée, qui doit être pure à 100%. Chaque pays peut avoir sa propre norme qui est établie par le groupement des producteurs et des utilisateurs locaux. De nombreux paramètres intervenant dans la qualité des huiles essentielles ont amené les organismes de normalisation à imposer un certain nombre de règle :

- les règles générales d'étiquetage et de marquage des récipients,
- les règles de dénomination,
- les règles d'analyses physiques et techniques.

Les règles d'analyse physique concernent, principalement, les caractères organoleptiques (aspect, couleur, odeur), les caractéristiques physiques (densité relative, pouvoir rotatoire, indice de réfraction), les caractéristiques chimiques (indice d'acide, indice d'ester, miscibilité à l'éthanol) le profil chromatographique et la quantification des différents constituants.

Les huiles essentielles présentent quelques caractéristiques commerciales avantageuses :

- ce sont des produits à fortes valeurs ajoutées bien plus intéressantes que la vente des plantes en l'état ;
- ce sont des produits naturels, de forte concentration qui possèdent des arômes analogues à ceux de la plante d'origine ;
- la demande reste croissante même si les produits synthétiques tendent à envahir le marché du fait que le public apprécie mieux les produits naturels.

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

En ce qui concerne la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara, il n'existe pas encore de normes établies (Pronabio-Sypeam, 2001). Alors, chaque société de vente impose ses propres normes. Par exemple, la société Florilab[®] exige une teneur en 1,8 cinéole variant de 55 à 65%, de sabinène entre 12 et 17%, de terpinène-4-ol entre 2 et 3%, et d' α -terpinéol entre 5 et 10%.

III LES FACTEURS AFFECTANT LA BIOSYNTHESE DES HUILES ESSENTIELLES

La biosynthèse et la composition chimique d'une huile essentielle varient en fonction de plusieurs facteurs. Tous ces facteurs agissent individuellement ou en synergie sur les mécanismes physiologiques contrôlant la synthèse des métabolites secondaires constituant les huiles essentielles (Rangahau, 2001).

III.1 Facteurs climatiques

III.1.1 Quantité de l'eau

Des changements de composition de l'huile essentielle ont été constatés sous des conditions environnementales sèches au cours desquelles le développement de la feuille est retardé. Des modifications qualitatives et quantitatives de l'huile essentielle ont été rapportées chez les espèces xérophylls telles que *Artemisia absinthium*, *Matricaria chamomilla* et *Lavendula spica*. En général, les plantes irriguées contiennent beaucoup plus d'huiles essentielles que celles non-irriguées (Motsa, 2006).

III.1.2 Photopériodisme

La manipulation de la photopériode peut être bénéfique pour la production et la composition d'une huile essentielle. Faraoqi et al. (1999) ont démontré que les espèces de Menthe (*Mentha arvensis*, *Mentha citrale* et *Mentha cardiaca*) cultivées sous une longue photopériode produisent plus d'huiles essentielles que celles cultivées sous une courte photopériode.

III.1.3 Température

Les activités métaboliques et enzymatiques de la plante varient principalement en fonction de la température. Par conséquent, une température faible ou élevée pourrait affecter la production d'huiles essentielles ainsi que sa composition chimique. Chez le géranium, la biosynthèse de géraniol est favorisée par une température élevée tandis que celle de citronellol est stimulée par les mois froids (Motsa, 2006).

III.2 Facteurs pédologiques

Chez *Mentha piperita*, la composition des éléments minéraux du sol comme le Cuivre (Cu), Fer (Fe), Manganèse (Mn), Sodium (Na), Plomb (Pb) et celle des éléments organiques (N, P, K) affectent la production et la teneur de la composition de l'huile essentielle (Scavron et al., 2005). Ces auteurs ont démontré que plus les concentrations des éléments minéraux sont élevées, plus les proportions en acétate de menthyl, en menthofurane, en 1,8-cinéole et en limonène sont importantes.

III.3 Facteurs biotiques et anthropiques

III.3.1 Les pathogènes

L'attaque des pathogènes et des animaux ravageurs a des effets négatifs ou positifs sur la quantité et la qualité des huiles essentielles extraites. Par exemple, les feuilles du poivrier (*Mentha piperita*) infectées par les pathogènes présentent un maximum en menthofurane (Gershenzon et al., 2000). Ces auteurs rapportent également que le dommage causé par les herbivores sur les feuilles de coton entraîne une libération de pinène, de β -pinène, de myrcène, de limonène et de quelques sesquiterpènes.

III.3.2 La fréquence des récoltes

De nombreuses études ont montré un effet significatif de la fréquence de récoltes sur la production et la composition chimique des huiles essentielles. En effet, le court intervalle entre les récoltes entraîne une diminution de la production de l'huile essentielle et une modification de sa composition chimique. Selon Motsa (2006), un intervalle de récolte de 2 mois donne une faible production d'huile de géranium alors que l'élargissement de la période entre les récoltes entraîne une augmentation du rendement (Motsa, 2006). Cependant, un intervalle de temps court entre les récoltes se traduit par un faible rapport citronellol / géraniol, qui est le profil d'huile de géranium recherché par les producteurs.

III.4 Facteurs physiologiques

III.4.1 Age chronologique de plante

C'est l'âge de la plante depuis la germination jusqu'à la sénescence (mort). La durée de vie de la plante varie selon les espèces végétales. Elle peut atteindre jusqu'à plusieurs années (plus de 100 ans) pour les plantes dites pérennes comme les arbres. Par contre, le cycle de vie de certaines espèces dites annuelles ne dure qu'une année. De nombreuses études ont démontré l'effet de ce facteur sur la production et la composition chimique des huiles essentielles. Chez les géraniums, la concentration en géraniol diminue avec l'âge chronologique de la plante (Motsa, 2006). Chez *Salvia bractera*, la teneur en α -pinène et en β -pinène diminue avec l'âge de la plante. Par contre la proportion en α -terpinéol, en limonène et en terpinène 4-ol augmente avec l'âge. (Amiri, 2006).

III.4.2 Cycle phénologique de la plante

C'est le cycle de vie de la plante. Chez un individu adulte, il peut se diviser généralement en quatre phases :

- la phase végétative ou phase de croissance ou feuillaison,
- la phase de floraison,
- la phase de fructification,
- et la sénescence.

La durée de chaque phase est différente d'une espèce végétale à l'autre. La phénologie est dépendante des conditions climatiques. Rao et al. (2002) et Weiss (1997) ont montré que la production d'huiles essentielles est élevée lors de la préfloraison, très forte au moment de la floraison puis chute après la floraison chez *Pelargonium sp.* Une étude portée sur la variation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a confirmé que les concentrations des composés majeurs qui déterminent la qualité de l'huile (pulegone et menthone) varient en sens inverse, pendant la pleine floraison. Les autres composés tels que le myrcène et l'humulène sont faibles lors de la phase de floraison (Amiri, 2006).

III.4.3 Stade ontogénique de la feuille

L'âge ontogénique correspond à l'âge de l'organe depuis son initiation. Le développement des feuilles passe par plusieurs stades, caractérisés par des changements de morphologie et de couleur, depuis le débourrement jusqu'à la chute.

Il existe trois principaux stades de développement pour la feuille :

- **Le stade juvénile** qui correspond à une feuille en cours d'expansion jusqu'à l'atteinte de sa taille maximale.

La durée varie en fonction de l'espèce, de 10 à 21 jours pour *Mentha piperita* (Marie, et al., 2000) et de 7 à 28 pour *Cantharantus roseus* (Mishara, 2007) .

- **Le stade adulte** ou mature correspond aux feuilles en fin de croissance ou complètement matures dont la durée varie également selon les espèces avec 27 à 40 jours pour les feuilles de *Mentha piperita* et 35 à 56 jours pour celles de *Cantharantus roseus*.

- **Le stade sénescant** ou abscission correspond aux feuilles en début de sénescence jusqu'à l'abscission. La durée varie selon les espèces avec 42 à 55 jours pour *Mentha piperita* et 63 à 77 jours pour *Cantharatus roseus*. (Marie et al., 2000 ; Mishara, 2007).

III.5 Paramètres de la distillation

III.5.1 Méthode utilisée

La méthode de distillation peut aussi affecter la qualité et la quantité des huiles essentielles car celles-ci sont constituées de composés volatils, solubles dans certains solvants organiques et dans l'alcool et peu ou pas solubles dans l'eau. Selon le type de distillation appliquée, la quantité des huiles essentielles et leur qualité changent. Par exemple, chez le géranium, l'hydrodistillation a donné une huile riche en ester qui est la qualité recherchée. Selon Chiasson et al. (2001), la méthode de distillation à la vapeur est la méthode produisant la meilleure qualité d'huile chez *Artemisia absinthium* et *Tanacetum sp.*

III.5.2 Durée de la distillation

Selon la durée de l'extraction, le rendement en huile essentielle change. Dans le cas de l'essence d'ylang-ylang, la distillation dure 14 heures. Les parfumeurs, trouvant plus suave et plus fine l'odeur des premières parties de l'huile distillée contenant seulement les composants les plus volatils. Ces derniers prélèvent, au fur et à mesure de la distillation, 4 parties dénommées : extra, première, deuxième et troisième, qu'ils vendent à prix dégressifs sous ces appellations. Pour le ravintsara, environ 80% de la totalité des huiles sont extraites dès la première heure et au bout de trois heures, presque la totalité des huiles est collectée.

MATERIELS ET METHODES

I MATERIEL VEGETAL

Les feuilles fraîches de *Cinnamomum camphora* ont été utilisées comme matériel végétal destiné à l'extraction d'huiles essentielles. Les pieds de *Cinnamomum camphora* se trouvent dans 3 sites différents autour d'Antananarivo: Itaosy, Betongolo, Nosiala Ambohidratrimo (Tableau 1).

Tableau 1: Description des individus de *Cinnamomum camphora* identifiés pour l'analyse des huiles essentielles extraites de feuilles.

Facteurs étudiés	Site	Age (ans)	Nombre
Age chronologique/Phénologie	Nosiala	5	1
Age chronologique/Phénologie	Nosiala	15	1
Age chronologique/Phénologie	Itaosy	>30	1
Age chronologique/Phénologie	Betongolo	>60	1
Age ontogénique des feuilles	Nosiala	15	4

I.1 Age ontogénique de la feuille

Du débourrement jusqu'à l'abscission de la feuille, cinq stades bien distincts ont été identifiés chez *Cinnamomum camphora* (Figure 4). Chaque stade de développement de la feuille se distingue par son âge d'apparition, sa couleur, sa rigidité et sa taille.

- ❖ **Stade 1** : feuille juste débourrée de 1 à 14 jours, colorée en rouge;
- ❖ **Stade 2** : feuille jeune en expansion, âgé de 14 à 45 jours, de couleur verte claire;
- ❖ **Stade 3** : feuille complètement mature en fin de croissance, âgée de 75 jours de couleur verte foncée;
- ❖ **Stade 4** : feuille en début de sénescence jusqu'à l'abscission;
- ❖ **Stade 5** : feuille sénescence juste tombée sur le sol de couleur jaune ou rouge.

Des feuilles appartenant à chaque stade de développement ont été fraîchement récoltées à partir de deux individus de même âge et distillées au Laboratoire d'Analyses des Huiles Essentielles de l'IMRA. La quantité et la qualité de l'huile essentielle produite ont été alors déterminées pour chaque stade de développement. Cette étude a été effectuée au mois de Mai 2008, au cours duquel les 5 stades décrits ci-dessus coexistent sur un même arbre.

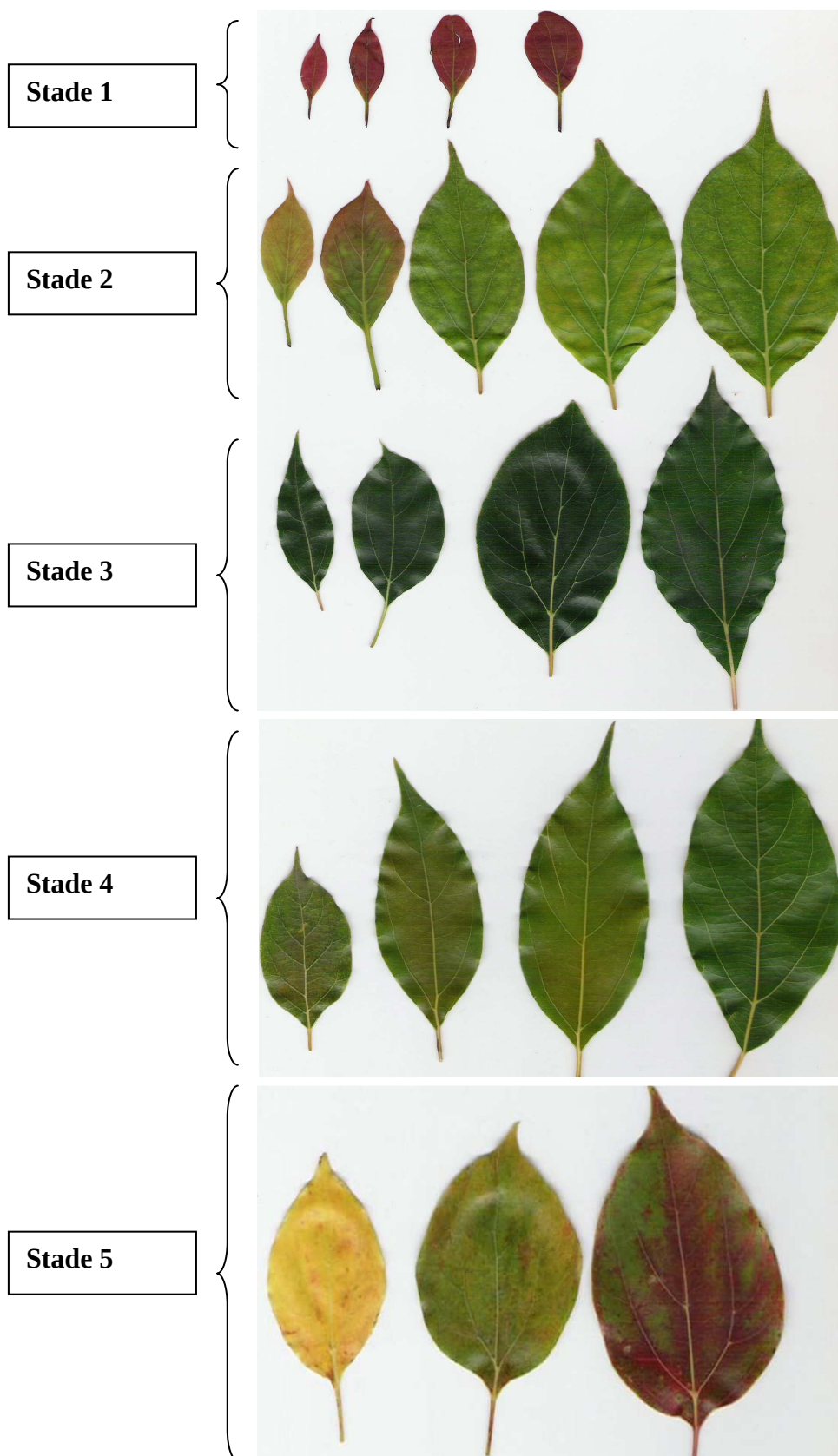


Figure 4: Les différents stades de développement des feuilles de *Cinnamomum camphora*

I.2 Age chronologique de la plante

Afin d'évaluer la variation qualitative et quantitative de l'huile essentielle de ravintsara en fonction de l'âge des individus, des feuilles fraîchement récoltées sur des pieds de *Cinnamomum campona* d'âges différents ont été utilisées comme matériel végétal (Tableau 1). Le lot de feuilles est constitué des différents stades de développement dans leur proportion naturelle au moment de la récolte. L'âge des individus de 5 et 15 ans est donné avec une précision de plus ou moins une année. L'âge chronologique des autres individus plus vieux (>30 ans, >60 ans) est déterminé par rapport à l'année d'établissement du domaine où ils poussent. Les variations de la quantité et de la qualité de l'huile essentielle produite par ces individus ont été suivies et comparées au cours de l'année.

I.3 Saison de récolte

Les variations saisonnières du rendement et de la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara ont été suivies tous les mois pendant un an. Le lot de feuilles est constitué des différents stades de développement dans leurs proportions naturelles au moment de la récolte. Les résultats représentent le rendement moyen (ou la teneur moyenne dans le cas de la composition chimique) calculé à partir des rendements d'extraction obtenus pour tous les individus quel que soit l'âge (4 échantillons par mois).

Les résultats des analyses d'échantillons commerciaux d'huiles essentielles de ravintsara apportés par les opérateurs de 2005 à 2007 sont regroupés pour étudier la variation mensuelle de leur composition chimique pendant un an (24 échantillons par mois).

I.4 Cycle phénologique

Le cycle phénologique du *Cinnamomum camphora* est dépendant des paramètres climatiques qui peuvent moduler la longueur relative de chaque phase (débourrement, floraison, fructification, chute des feuilles). Tous les mois, la production et la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara ont été suivies. Simultanément, les limites temporelles des phases phénologiques de l'espèce ont été déterminées pour l'année 2008 à Antananarivo.

Des feuilles fraîches constituées par les différents stades ont été récoltées à partir d'individus appartenant à chaque catégorie d'âge car seuls les spécimens adultes de 30 et 60 ans présentent un cycle phénologique complet.

II METHODES

Afin de suivre l'évolution du rendement et de la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara, les travaux ont été répartis en quatre étapes principales : (1) la récolte des feuilles, (2) la distillation au laboratoire, (3) l'analyse des huiles essentielles obtenues et (4) l'identification des différents constituants de l'huile essentielle.

L'extraction, le stockage et l'analyse de tous les échantillons d'huile essentielle de ravintsara sont soumis à des méthodes et à des conditions opératoires identiques.

II.1 Collecte du matériel végétal

L'absence de symptômes de maladies sur les feuilles est le critère de sélection des individus de ravintsara choisis pour cette étude. Pour chaque prélèvement, environ 500g de feuilles ont été collectées et préparées pour les opérations d'extraction. La récolte des feuilles a été effectuée le matin.

II.2 Extraction de l'huile essentielle

Dans le cadre de cette étude, la méthode de distillation par entraînement à la vapeur a été utilisée.

➤ Principe d'hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode qui consiste à immerger directement le matériel végétal intact dans de l'eau qui est portée à ébullition. Les constituants volatils des végétaux libérés par l'éclatement de cellules ont été entraînés par la vapeur d'eau. Après condensation par un réfrigérant, l'huile essentielle et l'eau se séparent par siphonnage ou par décantation (différence de densité). C'est une technique intéressante surtout pour les produits volatils car elle permet d'avoir une extraction plus complète en utilisant moins de vapeur dans un minimum de temps.

➤ Appareillage

Les feuilles fraîchement récoltées ont été distillées dans un hydrodistillateur de type Clevenger modifié constitué par un chauffage électrique, une cocotte minute transformée, un essencier et réfrigérant (Figures 5 et 6). La distillation a été effectuée au laboratoire le jour même de la récolte des feuilles.



Figure 5 : Cocotte minute transformée en extracteur d'huile essentielle

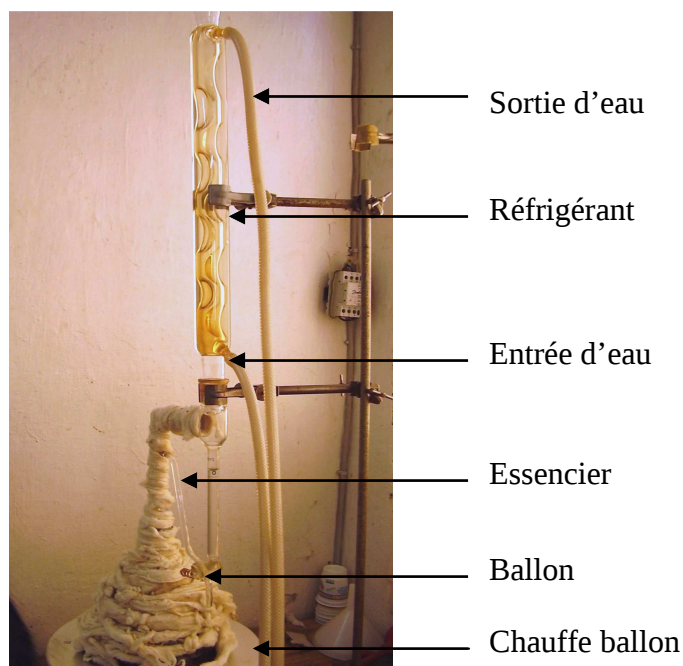


Figure 6: Appareil de distillation type Clevenger

➤ Mode opératoire

Pour chaque expérience, environ 500g de feuilles ont été distillées dans 1 litre d'eau. La durée de la distillation a été fixée à trois heures, à partir de la tombée de la première goutte (eau + huile essentielle) (Annexe I).

➤ Calcul du rendement

Le rendement (R) exprimé en pourcentage est le rapport entre la masse de l'huile essentielle et la masse de feuilles fraîches utilisées

$$R (\%, m/m) = \frac{MH}{MV} \times 100$$

MH (g) : masse de l'huile essentielle obtenue

MV (g) : masse du matériel végétal

II.3 Détermination de la composition chimique

II.3.1 Analyse de l'huile essentielle

➤ La Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la plus appropriée pour la séparation des différents constituants d'un mélange complexe volatile, leur identification (analyse qualitative) et leur dosage (analyse quantitative). Elle présente un haut pouvoir de résolution car elle est capable de séparer des constituants relativement proches sans décomposition (Ramanoelina, 2006). La séparation résulte de la différence de coefficients de partage entre les divers solutés et se manifeste par des temps de séjour différents à l'intérieur de la colonne. Le temps de rétention qui est une constante caractérise les composants conformément aux conditions opératoires.

Tous les processus chromatographiques nécessitent alors la présence de trois composants :

- La phase fixe constituée par les adsorbants fixés sur la colonne;
- La phase mobile circulant continuellement dans la colonne;
- Le produit à analyser se répartissant entre les deux phases.

D'autres méthodes plus sophistiquées généralement plus efficaces sont utilisées pour l'étude des huiles essentielles telles les couplages CPG/SM, CPG/DIF et CPG/FTIR. Elles constituent des compléments pour l'identification des différents composants de l'huile essentielle (Ratsimanohitra, 2001).

Dans le présent travail, la chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (CPG/ DIF) a été utilisée pour identifier et séparer les différents constituants chimiques de l'huile essentielle

➤ La chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (CPG/ DIF)

❖ Principe

L'échantillon a été introduit dans la chambre d'injection par l'intermédiaire d'une micro seringue. Il a été vaporisé sous l'action d'une forte température (plus élevée que celle de la colonne). Ensuite, les différentes molécules du soluté sont entraînées par le gaz vecteur dans la colonne où ces constituants ont été séparés et retenus par la phase stationnaire selon leur affinité avec cette phase (Figure 7).

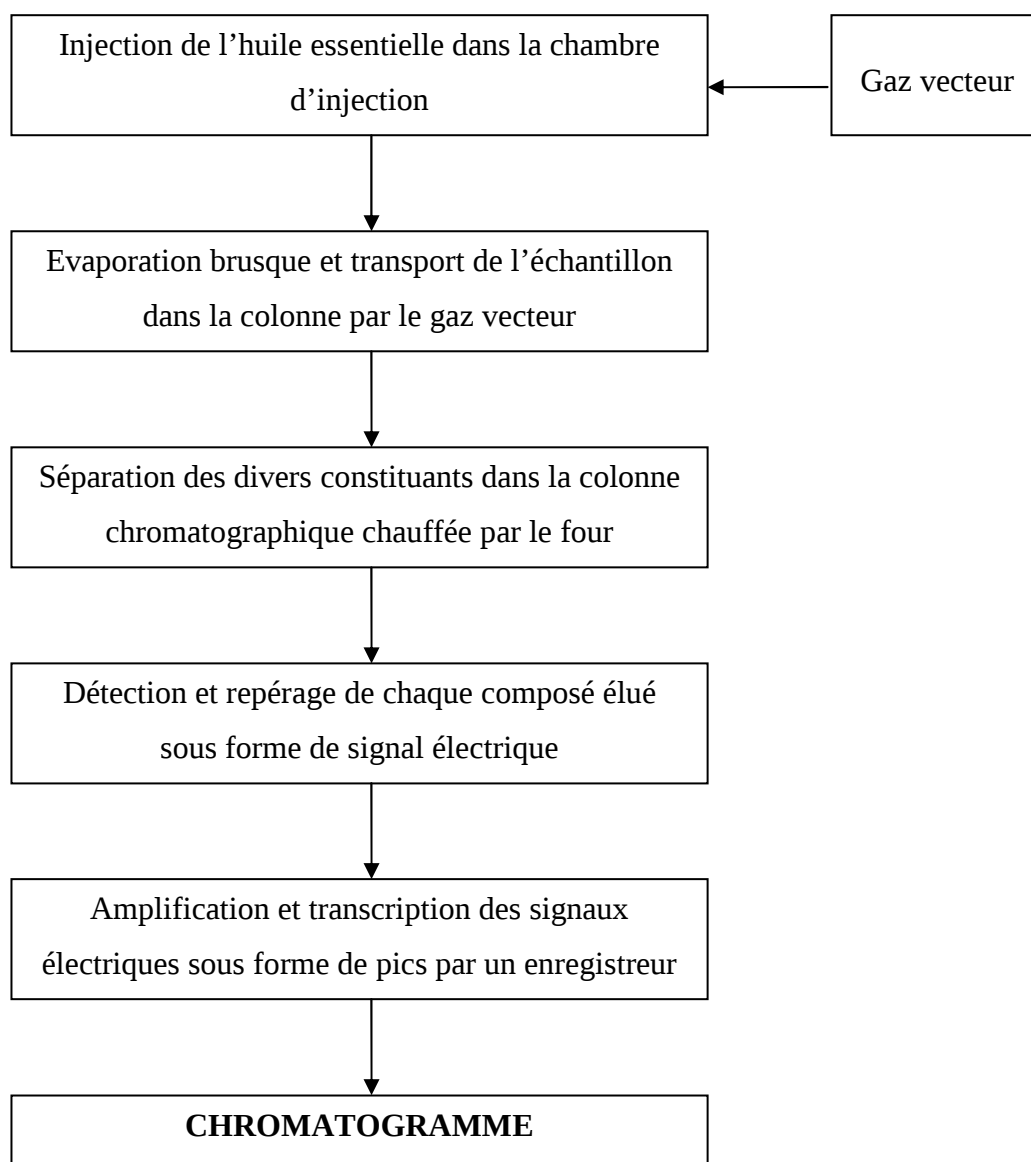


Figure 7: Diagramme simplifié du principe de la chromatographie en phase gazeuse

Elles en sortent les unes après les autres avec des vitesses différentes, c'est-à-dire que les constituants chimiques n'ont pas le même temps de rétention et le même ordre de sortie. A la sortie de la colonne, les constituants ont été récupérés par un détecteur qui procède à l'évaluation de leur quantité, les amplifie et les envoie vers un intégrateur. Il trace la courbe appelée chromatogramme (donnant les pics représentant chaque élément) et donne directement les temps de rétention, l'aire de chaque pic et les concentrations.

❖ **Appareillage**

Les huiles essentielles ont été analysées sur un chromatographe GC8000TOP (CE Instrument) avec un détecteur à ionisation de flamme muni d'un injecteur automatique AS 800 (Figure 8).

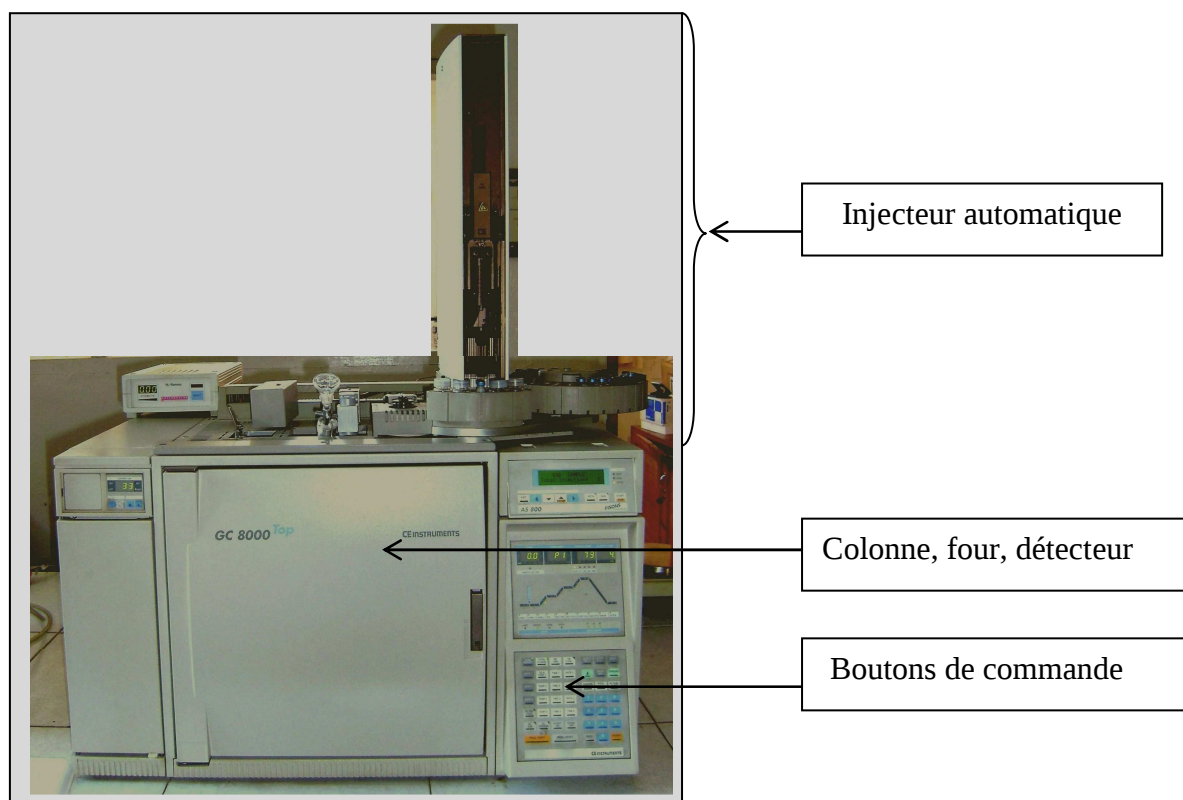


Figure 8 : CPG/DIF GC 8000 TOP avec injection automatique AS 800

Cet appareil est assisté par un ordinateur par l'intermédiaire d'un logiciel Chrom-card[®]. Il est constitué par :

- **Un four** permettant de programmer la température;
- **Un injecteur** qui a pour rôle de vaporiser le soluté dans un temps aussi bref que possible afin d'éviter la décomposition ou la polymérisation des éléments fragiles;
- **Une colonne**, formée d'un tube en acier inoxydable plus ou moins long garni d'un support solide interne en silice.

Une fois rendus volatils, les constituants de l'huile essentielle vont traverser la colonne, grâce au gaz porteur, où ils seront séparés. Il existe deux types de colonne (colonne remplie et colonne capillaire), mais nous avons utilisé la colonne capillaire qui présente une plus grande efficacité et un haut pouvoir de résolution.

Elle est constituée d'un tube vide imprégné intérieurement, de façon uniforme d'une couche mince en silice de phase stationnaire.

- **Détecteur et enregistreur**

Un enregistreur couplé au détecteur permet d'obtenir un diagramme sous forme de pics correspondants aux différents constituants : c'est le chromatogramme. A la sortie de la colonne, les constituants volatils mélangés avec l'hydrogène sont brûlés dans l'air, ils sont transformés en ions et ces derniers sont captés par une électrode, ce qui provoque un courant électrique qui est ensuite amplifié. Le FID est caractérisé par sa sélectivité, linéarité et sensibilité. L'enregistreur reçoit ces signaux et enregistre leur variation en fonction du temps de rétention des constituants.

II.3.2 Identification des pics

Pour la détermination des pics, il existe plusieurs méthodes:

- utilisation d'étalons secondaires;
- comparaison des indices de Kovats de chaque pic avec ceux dans la littérature;
- superposition de deux chromatogrammes en faisant coïncider le profil chromatographique de l'échantillon avec celui des huiles essentielles déjà connues qui servent de référence;
- détermination des Indices Esters Méthylique d'Acide Gras (EMAG).

Dans ce travail, cette dernière méthode sera utilisée pour identifier les pics obtenus sur les chromatogrammes.

❖ **Indice de Rétention calculés avec EMAG**

Ces techniques consistent à comparer les pics de nos chromatogrammes, par superposition avec ceux des EMAG. Pour identifier les composés, le Laboratoire d'Huile Essentielle de l'IMRA utilise les EMAG (C₅ à C₂₅) à la place des alcanes linéaires comme produits de références. Ce laboratoire dispose d'une banque de données à partir des différentes analyses d'huiles essentielles effectuées depuis sa création.

Les études de reproductibilité faites ont permis de démontrer que ces indices d'EMAG ne présentent aucune variation significative par rapport aux divers facteurs.

Le principe d'identification des principaux constituants par les indices d'esters requiert la réalisation d'une analyse CPG sur colonne moyennement polaire (polyéthylène glycol) en mode de programmation de température.

❖ **Mode opératoire :**

- injection des esters méthyliques d'acide gras,
- injection de l'huile essentielle à analyser ;
- obtention des chromatogrammes et détermination des indices d'ester $I(x)$ des différents constituants selon la formule suivante :

$$I(x) = 100x \cdot n + \left(\frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n} \right)$$

$I(x)$: indice d'ester du composé x

n : nombre de carbone d'ester méthylique d'acide gras élué avant x ,

$n+1$: nombre de carbone d'ester méthylique d'acide gras élué après x ,

T_x, T_n, T_{n+1} : Température de sortie du composé x et des esters méthyliques élués avant et après x . Elle est obtenue à partir de la relation suivante:

$T_r(^{\circ}\text{C}) = 50 + 5 t_r(x)$ où $t_r(x)$: temps de rétention du composé x et la relation de $I(x)$.

- comparaison des $I(x)$ à ceux d'une banque d'indices correspondant à des composés témoins par le laboratoire ;
- attribution du nom de chaque composé.

II.4 Analyses des données

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé l'analyse de variance (ANOVA) sous le logiciel statistique GenStat[®] Discovery pour analyser l'effet de l'âge ontogénique des feuilles, l'âge chronologique de l'individu, de la saison et du cycle phénologique sur le rendement et sur la composition des huiles essentielles. Ensuite, un test de comparaison des moyennes a été réalisé à partir de la valeur du LSD (Least Significant Difference) ou plus petite différence significative. La significativité du test est fixée avec un risque $\alpha=0,05$.

RESULTATS

I VARIATION DU RENDEMENT EN HUILE ESSENTIELLE DE RAVINTSARA EN FONCTION DES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES

I.1 Variation du rendement selon l'âge ontogénique des feuilles

La Figure 9 montre le rendement obtenu pour des échantillons constitués de chacun des 5 stades de développement de la feuille pris séparément. Le rendement en huile essentielle augmente progressivement de 1,04% pour les feuilles très jeunes (stade 1) à 1,43% pour les feuilles matures en fin de croissance (stade 3). Puis, il diminue à 1,21% pour celles qui sont sénescences (stade 4).

I.2 Rendement et âge chronologique de la plante

Les résultats présentés dans la Figure 10 correspondent aux moyennes des rendements obtenus à différentes périodes de l'année, pour chaque individu d'âge défini. En général, le rendement de l'huile essentielle diminue progressivement avec l'âge chronologique de la plante. Le meilleur rendement est obtenu pour des plantes jeunes de 5 ans avec une teneur moyenne de 1,73%, puis diminue significativement à 1,15% pour les plantes de 15 ans. Au-delà de cet âge, les différences entre les teneurs en huile essentielle ne sont pas significatives.

I.3 Rendement et proportion des différents stades de développement des feuilles

L'évolution du rendement mensuel en huile essentielle au cours de l'année est présentée sur la Figure 11. La production d'huile diminue de 1,06 à 0,81% de Mars à Juillet. Elle augmente, ensuite, et atteint un maximum au mois de Décembre avec 1,16%.

La Figure 12 montre l'évolution du développement des feuilles au cours de l'année. Les feuilles de stade 1 présentent un pic au mois de Septembre et constituent 30% des feuilles de l'arbre. Les feuilles de stade 2 composent environ 60% des feuilles en Octobre. Par ailleurs, les feuilles de stade 3 atteignent des proportions maximales au cours des mois de Novembre et Décembre avec 90-100% des feuilles, diminue ensuite très significativement dès le mois de Juin pour atteindre une proportion minimale de 20% en Septembre. Enfin, les feuilles de stade 4 et 5 présentent un pic au mois d'Août avec des proportions de 55 et 5%, respectivement. Alors, la proportion des feuilles matures est inversement proportionnelle aux proportions des feuilles des autres stades stade 1, 2, 4 et 5).

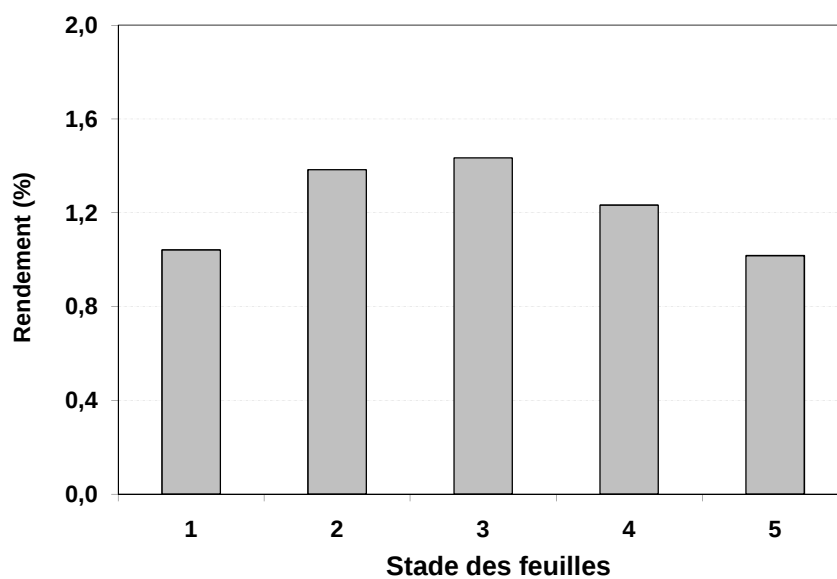


Figure 9 : Variation du rendement en huile essentielle suivant le stade de développement des feuilles de ravintsara.

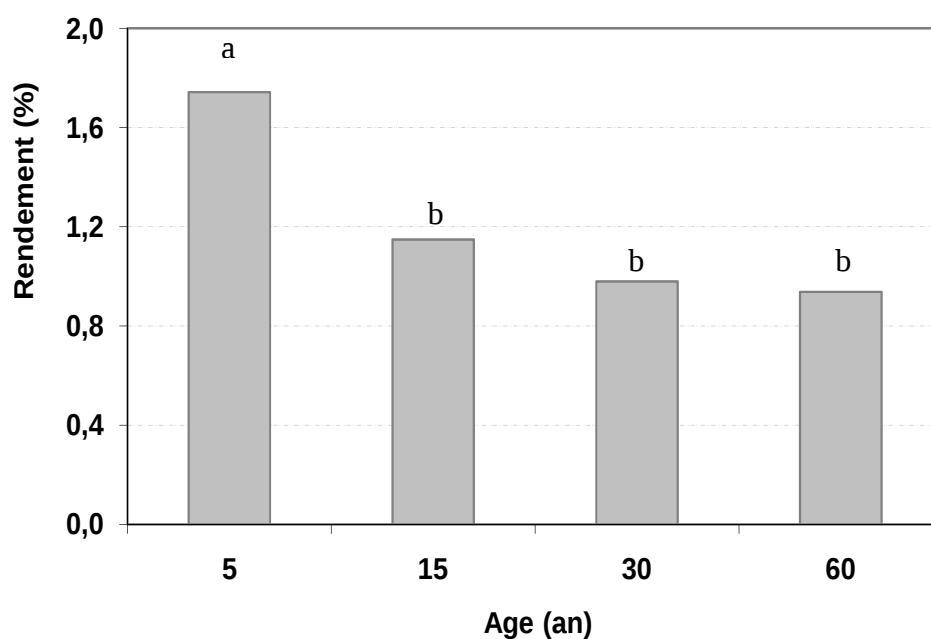


Figure 10 : Variation du rendement annuel en huile essentielle de ravintsara en fonction de l'âge chronologique de la plante. Les rendements moyens surmontés de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité $\alpha=0,05$.

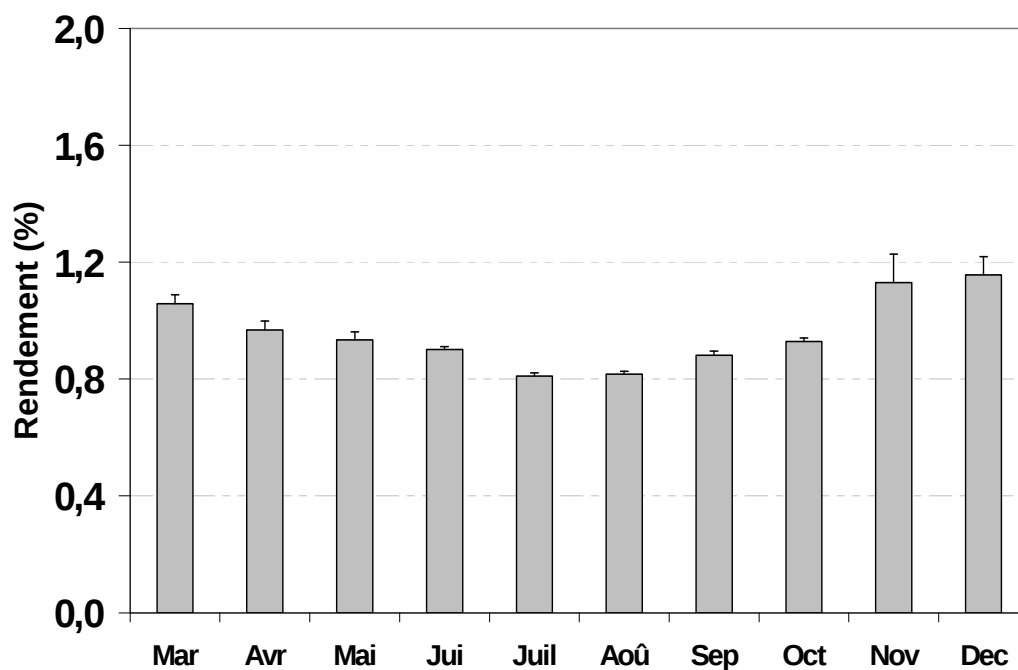


Figure 11 : Variation mensuelle du rendement en l'huile essentielle obtenu à partir d'un lot de feuilles constitué des différents stades de développement dans leur proportion naturelle au moment de la récolte.

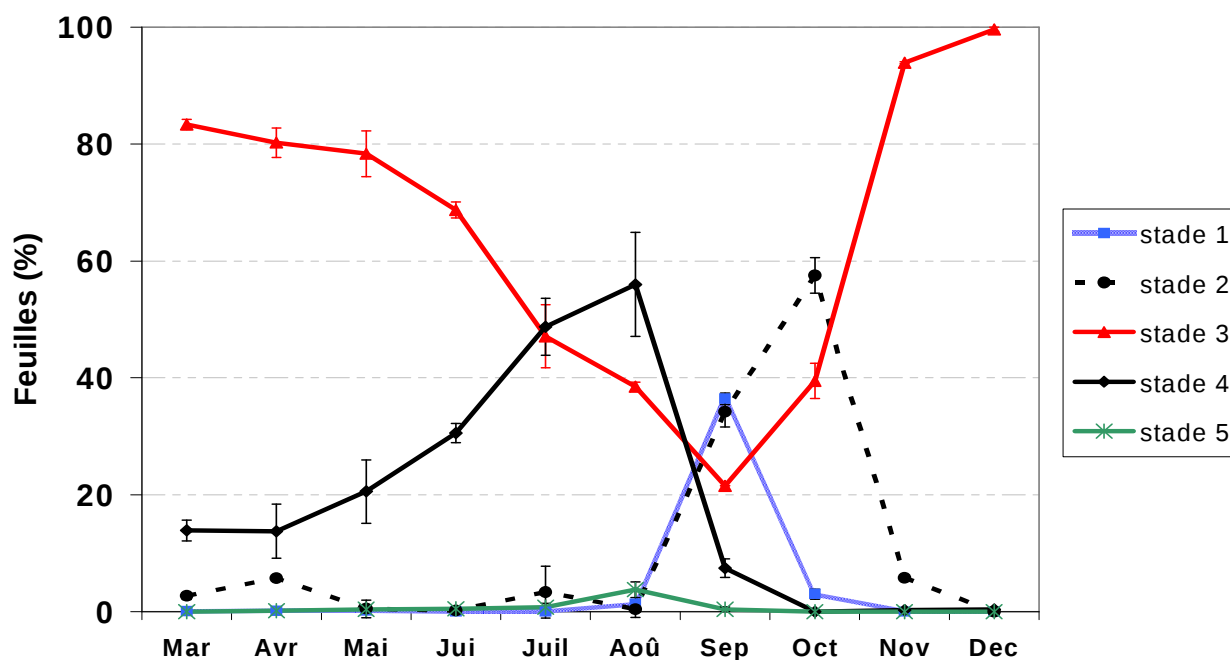


Figure 12 : Evolution de la proportion des différents stades de feuilles de *C. camphora* au cours de l'année.

I.4 Rendement et phénologie de la plante

Le suivi de sa phénologie pendant une année a permis de distinguer quatre phases bien distinctes :

- **la phase de débourrement des feuilles** se déroulant durant la saison sèche de Juillet à Août;
- **la phase de floraison** (individus adultes) débute par le débourrement des inflorescences et se termine au moment de la chute des fleurs. Elle correspond à **la phase de croissance ou d'expansion des feuilles** pour les individus jeunes qui n'ont pas encore atteint leur maturité physiologique. Cette phase se passe durant la saison chaude de Septembre à Octobre durant laquelle les feuilles juste débourrées atteignent leur taille maximale;
- **la phase de fructification** (individus adultes) correspond à la période de formation des fruits jusqu'à leur maturation allant de Novembre à Mars. Elle correspond à la **phase de feuillaison** pour les individus jeunes.

Durant cette phase, presque la totalité des feuilles a déjà atteint leur taille maximale. Ensuite, ces feuilles entament leur phase de sénescence, caractérisée par la dégradation des chlorophylles, qui coïncide avec la fin de la fructification;

- **la chute des feuilles** se passe durant la saison sèche d'Avril à Juin.

Les individus jeunes, âgés de 15 ans et moins n'ont pas encore atteint leur maturité physiologique et, par conséquent, ne présentent pas de phases de floraison et de fructification.

Les figures 13 et 14 montrent l'évolution de la teneur moyenne en huile essentielle en fonction de la phénologie de la plante, pour des individus mûres de 30 et 60 ans et des individus jeunes de 5 et 15 ans. Le rendement reste relativement faible, autour de 0,92%, durant la phase de débourrement des feuilles, quel que soit l'âge de la plante. Cette valeur augmente progressivement pour atteindre un maximum de 1,2% au moment de la fructification, concernant les individus matures, et de 1,8% au moment de la feuillaison pour les individus jeunes. Le rendement diminue, ensuite, aux environs de 1,2% au cours de la chute des feuilles.

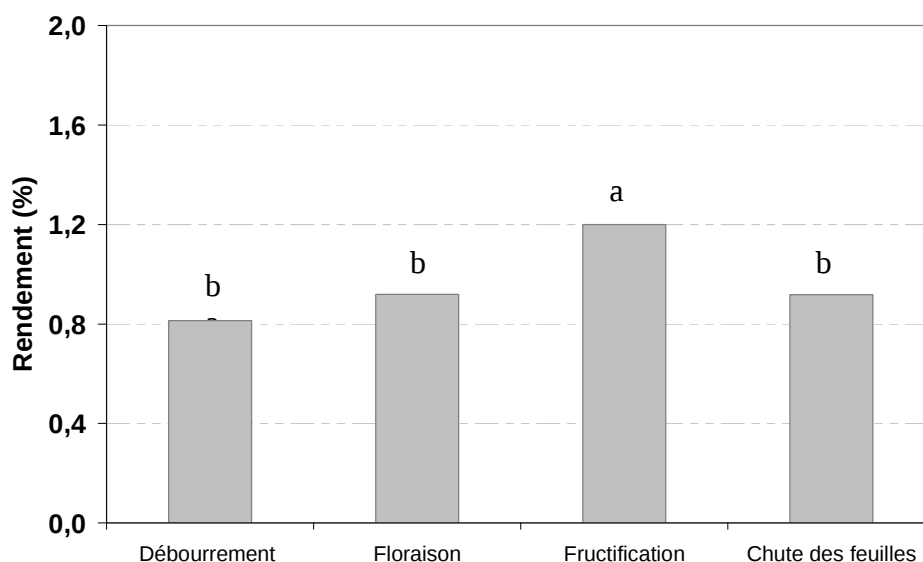


Figure 13 : Evolution du rendement en huile essentielle de ravintsara au cours du cycle phénologique d'individus adultes (30 et 60 ans). Les rendements moyens surmontés d'une même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité $\alpha=0,05$.

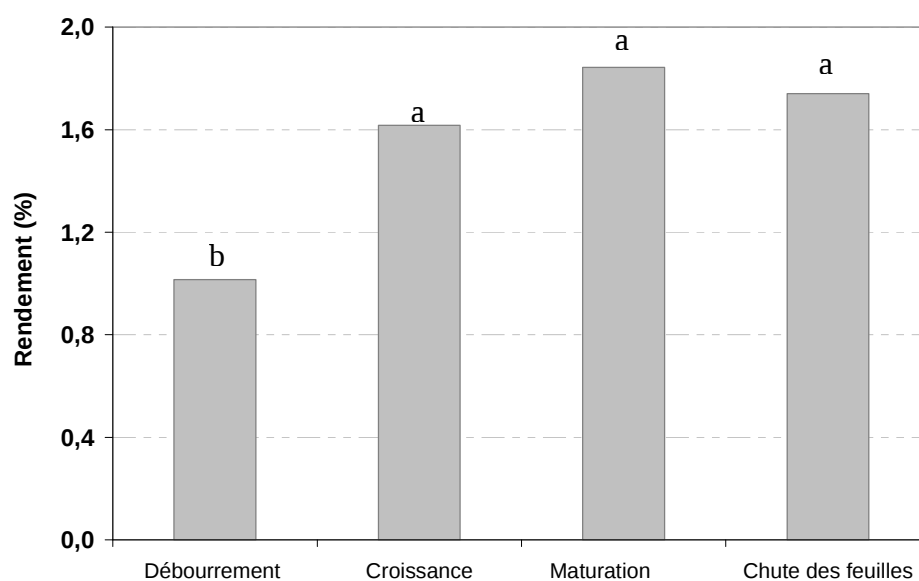


Figure 14 : Evolution du rendement en huile essentielle de ravintsara au cours du cycle phénologique d'individus jeunes (5 et 15 ans). Les rendements moyens surmontés d'une même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité $\alpha=0,05$.

II VARIATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE RAVINTSARA EN FONCTION DES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES

L'objectif de l'étude est d'évaluer la variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara suivant les stades de développement de la feuille, l'âge et la phénologie de la plante et d'effectuer un suivi au cours de l'année.

II.1 Composition chimique et âge ontogénique des feuilles

❖ Les hydrocarbures monoterpéniques

La teneur en monoterpènes est stable (autour de 28%) pour les feuilles de stade 1 à 4. Celle-ci diminue légèrement pour les feuilles de stade 5 (26,35%) (Tableau 2).

L' α -pinène, le β -pinène et le β -myrcène possèdent des pourcentages relatifs élevés dans les feuilles de stade 1 de 5,07, 3,59 et 1,79%, respectivement, tandis que dans les feuilles de stade 5, leurs concentrations diminuent sensiblement (4,13, 3,23 et 1,43%), respectivement, dans les feuilles matures. Par contre, la variation de la sabinène est caractérisée par une forte augmentation allant de 12,96% dans les feuilles de stade 1 à 15,67% dans les feuilles de stade 5 (Tableau 2).

Certains composés mineurs comme l' α -terpinène et le γ -terpinène possèdent des teneurs réduites (0,48 et 0,80%) dans les feuilles matures par rapport aux feuilles jeunes (1,24 et 1,99%) et sénescents (1,37 et 2,28%) (Tableau 2).

Tableau 2 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara suivant le stade de développement de la feuille

Constituants	Stades de feuilles				
	Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4	Stade 5
HYDROCARBURES MONOTERPÉNIQUES					
α-pinène	5,07	4,59	4,13	4,39	4,65
α-thuyène	0,77	0,65	0,63	0,67	0,96
camphène	0,12	0,11	0,14	0,10	0,11
β-pinène	3,59	3,32	3,23	3,29	3,34
sabinène	12,90	13,63	15,65	15,67	10,08
β-myrcène	1,79	1,66	1,43	1,39	1,52
α-phelladrène	0,05	0,06	0,06	0,08	0,11
α-terpinène	1,24	1,01	0,48	0,53	1,37
limonène	0,11	0,15	Trace	0,12	0,10
β-phellandrène	0,83	0,69	0,65	0,64	0,71
cis-β-ocimène	0,09	0,05			
γ-terpinène	1,99	1,64	0,80	0,87	2,28
trans-β-ocimène	0,55	0,36	0,07	0,07	0,07
p-cymène			0,07	0,10	0,33
cubébène		0,07	0,79	0,04	0,07
terpinolène	0,51	0,43	0,21	0,21	0,52
α-compaène	0,04	0,05	0,04	0,56	0,15
TOTAL	29,64	28,45	28,35	28,71	26,35
PRODUITS OXYGENES					
1,8-cinéole	54,97	57,68	59,36	56,45	57,62
linalool	0,04	0,04	0,04	0,29	0,07
acétate de linalyle	0,05	0,07	0,10	0,11	0,12
terpinène-4-ol	2,62	2,44	1,91	1,35	3,11
acetate de térapènyle		0,03			0,03
α-terpinéol	6,41	8,61	8,29	9,76	8,60
acétate de géranyle			0,07		0,03
cis-nérolidol	0,05	0,09		0,04	0,06
caryophyllène oxyde	0,05	0,06	0,03	0,06	0,03
trans-nérolidol	Trace	0,03	0,03	0,10	0,05
TOTAL	64,19	69,04	69,81	68,16	69,72
HYDROCARBURES SESQUITERPÉNIQUES					
β-élémente	0,17	0,15	0,03	0,08	0,13
β-caryophyllène	0,89	0,62	0,44	0,25	0,65
α-humulène	1,16	0,95	0,42	0,39	0,63
lédène	0,67	0,49	0,71	0,72	0,73
β-sélinène	0,46	0,44		0,19	0,36
α-murolène	0,25	0,22	0,13	0,09	0,18
β-cadinène	0,87	0,41	0,20	0,67	0,66
δ-cadinène	0,08	0,06	0,04	0,03	0,05
TOTAL	4,53	3,34	1,96	2,42	3,38
COMPOSES NON IDENTIFIES					
1		0,03	0,04		0,05
2	0,04	0,07	0,03		0,04
3	0,27	0,41	0,35	0,16	0,23
4					0,03
5					0,03
6					0,11
7					0,03
TOTAL	0,31	0,51	0,43	0,16	0,52

Par contre, la proportion maximale en cubébène (0,79%) est observée lorsque les feuilles sont matures. Aussi, la teneur en trans- β -ocimène est optimale (0,55%) dans le stade 1, puis diminue au fur et à mesure que les feuilles grandissent (0,07%).

❖ Les produits oxygénés

Les produits oxygénés sont largement représentés dans les feuilles quel que soit le stade de développement considéré. Leur pourcentage relatif est maximal (69,81%) au niveau des feuilles de stade 3 et minimal (64,19%) dans les feuilles de stade 1 (Tableau 2).

La concentration relative des constituants majoritaires des produits oxygénés varie en fonction du stade de développement de la feuille. La teneur en 1,8-cinéole passe de 54,97% dans les feuilles de stade 1 à 59,36% dans les feuilles de stade 3, puis diminue à 57,62% dans les feuilles de stade 5. La variation de la teneur en terpinène-4-ol est caractérisée par une diminution de 2,62 à 1,36% entre les feuilles de stade 1 et celles de stade 4, suivie d'une augmentation à 3,11% dans les feuilles de stade 5. Par contre, la teneur en α -terpinéol passe de 6,41% dans les feuilles de stade 1 à 9,78% dans les feuilles de stade 4, suivie d'une faible diminution à 8,60% dans les feuilles de stade 5 (Tableau 2).

Les composés minoritaires des produits oxygénés présentent également des variations. D'une part, la teneur de l'acetate de linalyle augmente en fonction du développement de la feuille. D'autre part, le cis-nérolidol disparaît dans les feuilles matures (Tableau 2).

❖ Les hydrocarbures sesquiterpéniques

La teneur maximale en sesquiterpènes est obtenue avec les feuilles de stade 1 (4,53%) alors que la teneur minimale est obtenue chez les feuilles de stade 3 (1,96%). Au delà de ce stade, la proportion en sesquiterpènes augmente pour atteindre 3,38% dans les feuilles de stade 5 (Tableau 2). En général, la teneur des différents composés constitutifs des sesquiterpènes tels que le β -élémane, le β -caryophyllène, α -humulène, le β -selinène et le β -cadinène diminue lorsque les feuilles atteignent leur maturité (stade 3).

❖ Les composés non identifiés

La teneur relative des constituants non déterminés varie en fonction du stade de développement de la feuille. Certains composés tels que le composé 4, 5, 6 et 7 ne sont présents que chez les feuilles de stade 5 (Tableau 2).

II.2 Composition chimique et âge chronologique de la plante

L'évolution des pourcentages relatifs de trois groupes de constituants de l'huile essentielle de ravintsara (monoterpènes, sesquiterpènes et produits oxygénés) suivant l'âge de la plante est illustrée sur la Figure 15.

➤ Les hydrocarbures monoterpéniques

Le pourcentage de monoterpènes diminue suivant l'âge chronologique de la plante. L'huile essentielle extraite à partir de feuilles de jeunes individus âgés de 15 ans au plus, possède plus de monoterpènes (29,12 %) que celle d'individus matures de plus de 30 ans (26,5%) (Figure 15). L'évolution des principaux constituants des monoterpènes (Figure 16) montre que le pourcentage relatif de l' α -pinène et du sabinène diminue avec l'âge, variant de 4,81 à 3,91% et 14,71 à 13,09%, respectivement. La teneur en β -myrcène et en β -pinène est quasiment stable.

➤ Les produits oxygénés

Avec une concentration plus élevée que celle des autres groupes de constituants de l'huile essentielle de ravintsara, le pourcentage de produits oxygénés varie de 68,42% pour les individus de 5 ans à 70,01% pour les individus âgés de 60 ans (Figure 15). L'évolution du 1,8-cinéole est caractérisée par une diminution de la concentration de 58,96 à 57,81% de 5 à 60 ans (Figure 17). Par contre, la teneur en terpinén-4-ol et celle de l' α -terpinéol augmentent avec l'âge, allant de 1,81 à 2,33% et de 7,20 à 9,17%. La teneur de l'acétate de géranyle qui est l'un des composés minoritaires des produits oxygénés tend à s'augmenter de 0,19 à 0,59% avec l'âge de la plante (Tableau 3).

➤ Les hydrocarbures sesquiterpéniques

La teneur en sesquiterpènes de l'huile essentielle de ravintsara augmente de 1,53% pour les plantes jeunes (5 ans) à 2,08% pour les plantes sénescents (60 ans) (Figure 15). Les pourcentages des constituants sesquiterpéniques dans l'huile essentielle de ravintsara sont très faibles (<1%). La teneur de ces composés varie peu ou pas suivant l'âge de l'individu. Néanmoins la teneur en α -muurolène est maximale (0,20%) dans les individus de 5 ans et minimale (0,05%) dans les plantes âgés de 60 ans (Tableau 3).

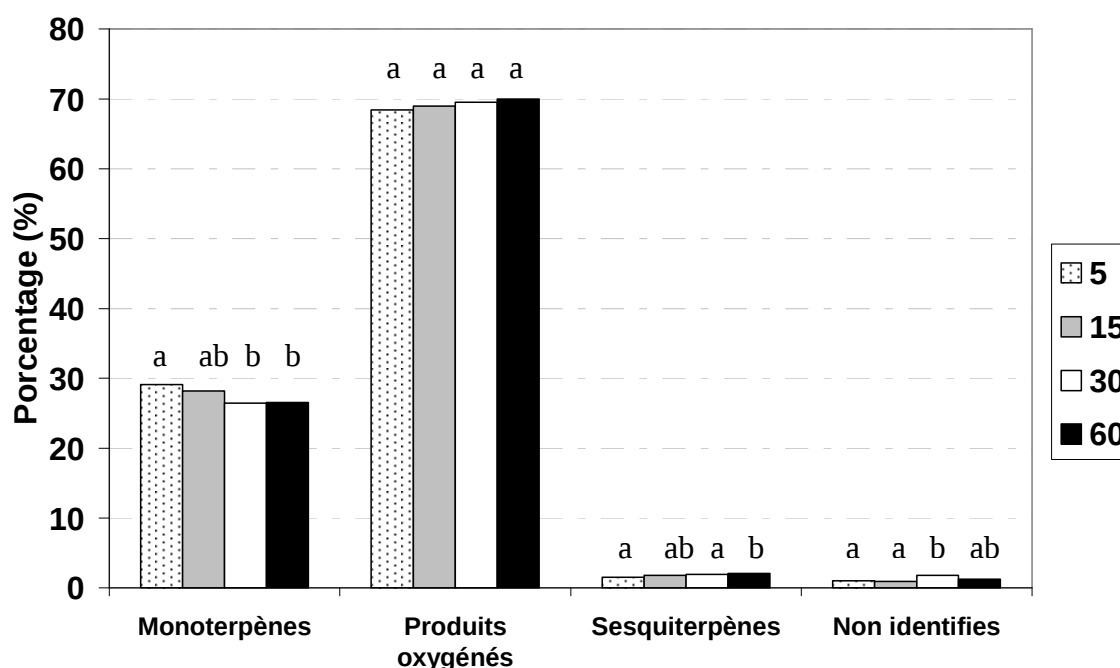


Figure 15 : Variation des monoterpènes, sesquiterpènes, produits oxygénés et composés non identifiés suivant l'âge de l'individu. Pour chaque groupe de constituants, les barres surmontées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

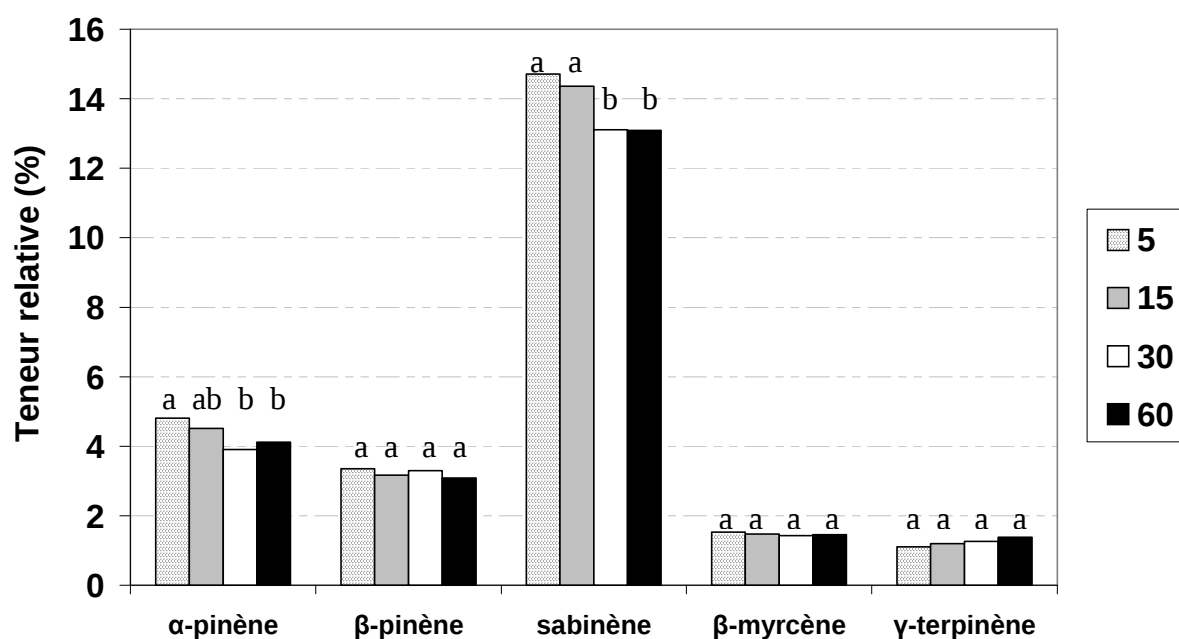


Figure 16 : Variation des principaux constituants des monoterpènes suivant l'âge de l'individu. Pour chaque composant, les barres surmontées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

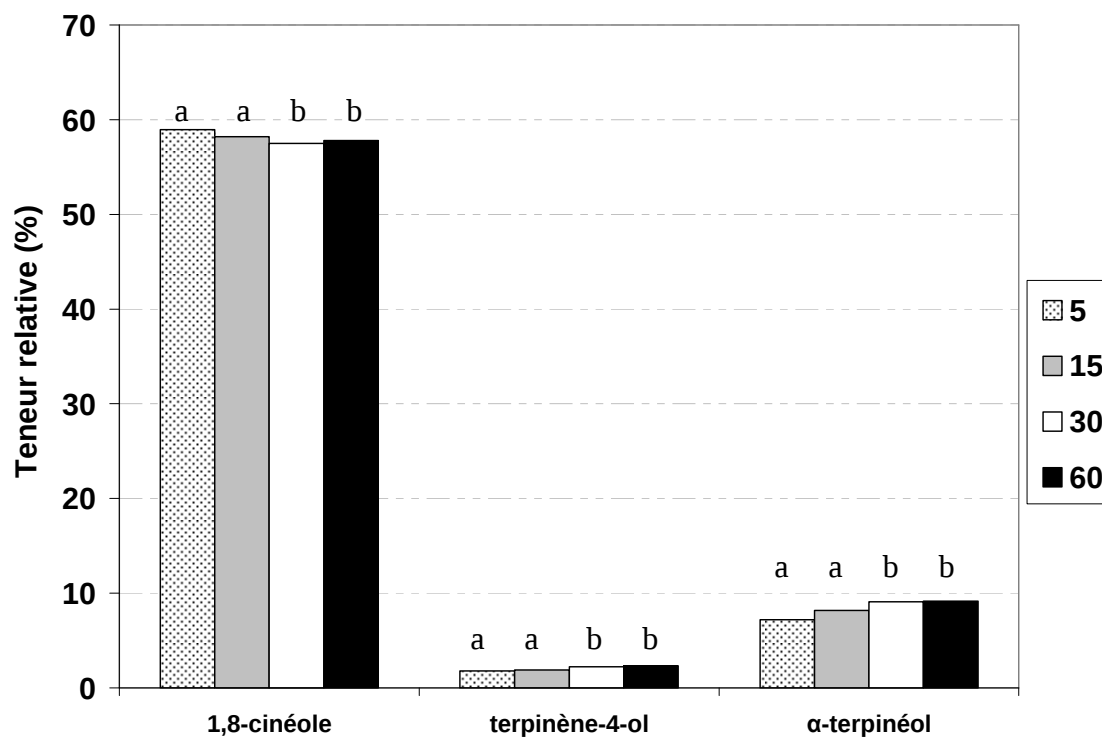


Figure 17 : Variation des principaux produits oxygénés suivant l'âge de l'individu. Pour chaque composant, les barres surmontées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

Tableau 3 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara suivant l'âge de l'individu.

Constituants	Age de la plante (année)			
	5	15	30	60
HYDROCARBURES MONOTERPÉNIQUES				
tricyclène	trace	0,13	trace	trace
α-pinène	4,81	4,52	3,91	4,12
α-thuyène	0,67	0,64	0,55	0,59
camphène	0,17	0,18	0,18	0,14
β-pinène	3,36	3,17	3,30	3,08
sabinène	14,71	14,36	13,10	13,09
β-myrcène	1,53	1,48	1,43	1,46
α-phelladrène	0,49	0,56	0,18	0,27
α-terpinène	0,75	0,73	0,72	0,85
limonène	0,66	0,58	0,37	0,61
β-phellandrène	0,46	0,73	0,74	0,67
cis-β-ocimène	0,18	0,03	0,04	0,04
γ-terpinène	1,11	1,21	1,27	1,39
trans-β-ocimène	0,17	0,13	0,20	0,17
p-cymène	0,11	0,09	0,09	0,09
cubébène	0,28	0,33	0,45	0,30
terpinolène	0,27	0,30	0,30	0,34
α-compaène	0,12	0,13	0,15	0,08
TOTAL	29,12	28,21	26,48	26,53
PRODUITS OXYGENES				
1,8-cinéole	58,96	58,21	57,49	57,81
linalool	0,07	0,08	0,11	0,08
acétate de linalyle	0,08	0,10	0,11	0,12
terpinène-4-ol	1,80	1,90	2,22	2,33
acetate de térapényl	0,04	0,06	0,08	
α-terpinéol	7,20	8,18	9,11	9,17
acétate de géranyle	0,19	0,36	0,30	0,59
cis-nérolidol	0,08	0,13	0,17	0,15
caryophyllène oxyde	0,06	0,07	0,09	0,08
trans-nérolidol	0,10	0,23	0,07	0,06
TOTAL	68,42	68,96	69,52	70,00
HYDROCARBURES SESQUITERPÉNIQUES				
β-élémente	0,07	0,11	0,10	0,11
β-caryophyllène	0,40	0,49	0,49	0,44
α-humulène	0,47	0,64	0,85	0,78
lédène	0,07	0,04	0,07	0,04
β-sélinène	0,20	0,14	0,15	0,29
α-murolène	0,20	0,15	0,18	0,05
β-cadinène	0,25	0,25	0,10	0,40
δ-cadinène	0,09	0,05	0,05	0,10
TOTAL	1,53	1,79	1,96	2,08
NON DETERMINES				
1	0,20	0,30	0,66	
2	0,17	0,05	0,16	0,03
3	0,05	0,05	0,06	0,07
4	0,05	0,05	0,06	0,09
5	0,04	0,05	0,06	0,05
6	0,04	0,07	0,08	0,06
7	0,03	0,08	0,05	0,05
8	0,06	0,07	0,06	0,07
9	0,05	0,06	0,05	0,05
10	0,11		0,10	0,25
11	0,13	0,09	0,16	0,09
12	0,08	0,05	0,16	0,04
13	0,13		0,03	
14	0,54	0,69	0,78	0,79
15	0,04		0,04	0,04
TOTAL	1,00	0,94	1,81	1,26
Nombre total	37	39	42	38

➤ **Les constituants non identifiés**

L'huile essentielle extraite à partir de feuilles d'individus adultes (30 à 60 ans) est caractérisée par un nombre de constituants élevés (42), en particulier, la teneur des composés non identifiés atteint un taux maximum de 1,81% (Tableau 3).

II.3 Composition chimique et saison

Dans cette partie, la composition chimique des échantillons d'huile essentielle de ravintsara obtenus au cours de nos expérimentations (échantillon expérimental) est comparée à celle des échantillons apportés par les opérateurs de la filière au LAHE et enregistrée dans nos bases de données de 2005 à 2007 (échantillon commercial).

❖ **Les hydrocarbures monoterpéniques**

• **L'huile essentielle commerciale**

Selon le Tableau 4 représentant l'évolution mensuelle des différents constituants de l'huile essentielle commerciale, les monoterpènes subissent une forte variation de leur proportion qui est minimale (26,99%) au mois d'Août et maximale (33,83%) au mois de Février. Cette variation est due principalement à :

- une diminution significative de l' α -pinène variant de 5,52% au mois d'Avril à 4,54% au mois d'Août ;
- une diminution du β -pinène de 3,12 à 2,35% de Février à Août ;
- une forte diminution de la sabinène de 15,4 à 11,95% entre Avril et Août ;
- une augmentation du γ -terpinène de 1,20 à 2,09% au mois Février à Juillet ;
- la disparition du cis- β -ocimène entre Août et Novembre ;
- l'apparition du β -phelladrène durant la période de pluie de Novembre à Mars avec une teneur moyenne de 0,74%.

La teneur en β -myrcène est relativement stable au cours de l'année avec une valeur moyenne de 1,43%, ne variant qu'entre 1,10 et 1,69% durant cette période.

Tableau 4 : Variation mensuelle de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle commerciale de ravintsara. Le LSD est déterminé avec un risque $\alpha=0,05$.

Constituants	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil	Aoû	Sep	Oct	Nov	Déc	LSD
HYDROCARBURES MONOTERPÉNIQUES													
α-pinène	5,29	5,35	5,52	5,39	5,41	5,18	4,54	4,54	5,39	5,32	5,08	5,29	<i>0,79</i>
α-thuyène	0,16	0,09		0,28		0,11	0,17		0,21	0,14	0,25		
camphène	0,38	0,21	0,19	0,15	0,33	0,17	1,07	0,34	0,23	0,22	0,23	0,26	
β-pinène	2,95	3,12	2,91	2,91	2,70	2,97	2,54	2,35	2,75	2,72	2,72	2,66	<i>0,55</i>
sabinène	14,93	14,47	14,35	15,43	14,58	14,73	13,50	11,96	13,56	13,71	13,33	14,21	<i>2,29</i>
β-myrcène	1,34	1,43	1,39	1,47	1,40	1,41	1,56	1,55	1,47	1,31	1,10	1,69	<i>0,44</i>
α-phelladrène	0,99	0,26									0,78	0,94	
α-terpinène	0,89	0,75	0,72	0,77	0,78	0,94	1,98	0,92	1,06	1,05	1,12	1,05	
limonène	0,80	0,84	0,65	0,90	0,67	0,66	0,72	1,26	0,78	0,99	0,88	0,89	
β-phellandrène	1,06	0,97	0,94	0,95	0,94	0,88	0,82	0,76	0,66	0,97	1,02	0,80	
cis-β-ocimène	0,53	0,82	0,54	0,97	0,08	0,50	1,86					0,48	
γ-terpinène	1,49	1,20	1,37	1,32	1,70	1,73	2,09	1,60	1,93	1,61	1,52	1,48	<i>1,15</i>
trans-β-ocimène	0,54	0,39	0,57	0,42	0,74	0,90	0,77	0,58	0,76	0,74	0,95	0,71	
p-cymène	0,43	0,35	0,38	0,15	0,24	0,26	0,32	0,20	0,12	0,52	0,49	0,29	
cubébène	0,30	0,36	0,28	0,35	3,62	0,60	0,15	0,28	0,05	0,33	0,54	0,38	
terpinolène	0,28	0,41	0,32	0,27	0,36	0,35	0,46	0,38	0,25	0,34	0,39	0,41	
α-compaène	0,36	0,27	0,28	0,31	0,31	0,38	0,28	0,27	0,36	0,29	0,25	0,36	
TOTAL	32,73	33,85	30,29	32,04	31,29	31,76	32,83	26,99	29,57	30,25	30,65	31,88	<i>4,25</i>
PRODUITS OXYGENES													
1,8-cinéole	56,84	56,96	57,48	56,59	56,36	55,97	53,70	52,07	56,33	58,30	58,71	58,55	<i>4,49</i>
linalool	0,14	0,14	0,24	0,17	0,21	0,12	0,27	0,12	0,20	0,20	0,26	0,13	
acétate de linalyle		0,44	0,15	0,11	0,10	0,09	0,06	0,08	0,10	0,09	0,10	0,13	
terpinène-4-ol	2,50	1,98	1,80	2,15	1,97	1,96	2,38	2,07	2,11	2,08	2,31	2,04	<i>0,58</i>
acétate de terpényl	0,77	0,66	0,09	0,38	0,36	0,08			0,63	1,48	0,30	0,10	
α-terpinéol	8,55	7,68	7,53	7,72	7,64	7,45	7,84	7,48	8,40	8,61	8,16	8,04	<i>1,49</i>
acétate de géranyle	0,37	0,09	0,13	0,22	0,11	0,12	0,14	0,09	0,29	0,09	0,09	0,13	
cis-nérolidol	0,09	0,10	0,10	0,11	0,10	0,06	0,10	0,09	0,12	0,04			
caryophyllène oxyde	0,16	0,08	0,35	0,28	0,33	0,07	0,10	0,05	0,05				
trans-nérolidol		0,21	0,10	0,18	0,10	0,06							
TOTAL	69,43	68,34	67,98	67,91	67,28	65,99	64,59	62,03	68,25	70,89	69,92	69,12	<i>4,68</i>
HYDROCARBURES SESQUITERPENIQUES													
β-élémente	0,89	0,96	0,77	0,78	0,77	0,72	0,70	0,80	0,68	0,86	0,86	0,72	
β-caryophyllène	0,40	0,11	0,32	0,27	0,11	0,08	0,17	0,42	0,11	0,17	0,16	0,13	
α-humulène	0,59	0,63	0,78	0,85	0,84	0,74	1,11	0,95	1,01	0,95	0,99	0,71	
lédène	1,21	0,73	0,63	0,66	0,80	0,74	0,98	1,03	0,86	0,83	0,99	0,95	
β-sélinène	0,53	0,31	0,30	0,58	0,11	0,35	0,09	1,41			0,31	0,20	
α-murolène	0,30	0,41	0,12	0,09	0,08	0,15	0,17	0,13	0,07	0,08	0,11	0,13	
β-cadinène	0,11	0,27	0,42	0,33	0,19	0,49	0,33	0,28	0,16	0,15	0,18	0,25	
δ-cadinène	0,88	0,65	0,22	0,40	0,50	0,35	0,20	0,49	0,21	0,25	0,11	0,19	
TOTAL	4,91	4,07	3,57	3,95	3,40	3,62	3,75	5,51	3,10	3,28	3,71	3,28	<i>2,63</i>
COMPOSES NON IDENTIFIES													
1		0,06	0,05	5,71	0,11	0,27	0,13	0,20	0,09	0,04	0,10	0,86	
2		0,09	0,06	0,04	0,15	0,23	0,15	0,24	0,06	0,07	0,07	0,23	
3		0,17	0,01			0,07	0,14	0,11	0,10			0,53	
4		0,53					0,12	0,29				0,06	
5							0,62	1,53					
6							0,14	0,32					
TOTAL	0,00	0,85	0,12	5,76	0,25	0,57	1,29	2,68	0,25	0,12	0,17	1,68	<i>1,40</i>

- **L'huile essentielle expérimentale**

Les monoterpènes de l'huile expérimentale présentent une teneur minimale (26,40%) au mois de Mars et maximale (30,12%) au mois de Juillet (Tableau 5).

La teneur en α -pinène reste relativement faible (autour de 3,70%) durant la saison sèche d'Avril à Juillet. Au delà de cette période, la teneur en α -pinène tend à s'accroître, et atteint une valeur maximale (5,40%) au mois de Novembre.

- La variation de la teneur en β -pinène n'est pas significative malgré une légère augmentation de 2,93% (Juillet) à 3,56% (Décembre) ;
- La teneur en sabinène marque une baisse significative de 13,48 à 11,34% du mois de Novembre à Décembre ;
- Le β -myrcène (teneur moyenne de 1,48) varie peu ou pas au cours de l'année. De même le γ -terpinène reste invariable ;
- Le tricyclène n'existe qu'au mois de Décembre avec une faible concentration (1,13%) tandis que le camphène et l' α -thuyène sont absents au mois de Novembre et Décembre, respectivement.

Les huiles essentielles provenant d'individus jeunes (5 et 15 ans) présentent une teneur en monoterpènes élevée entre les mois de Novembre et Mars (30-32%), diminue ensuite aux environs de 27% jusqu'au mois de Septembre (Figure 18).

Chez les individus âgés (30 et 60 ans), une forte baisse (8-10%) de la teneur en monoterpènes est enregistrée durant les mois de Juin et Juillet (Figure 18).

❖ **Les produits oxygénés**

- **L'huile essentielle commerciale**

En général, la teneur moyenne des produits oxygénés dans les huiles essentielles de ravintsara commercialisées varie de manière significative au cours de l'année. La concentration de ces constituants est élevée (70,02%) entre Octobre et Février c'est-à-dire durant la saison des pluies. Cette teneur amorce une baisse durant la saison sèche pour atteindre une valeur minimale (62,05%) au mois d'Août (Tableau 5).

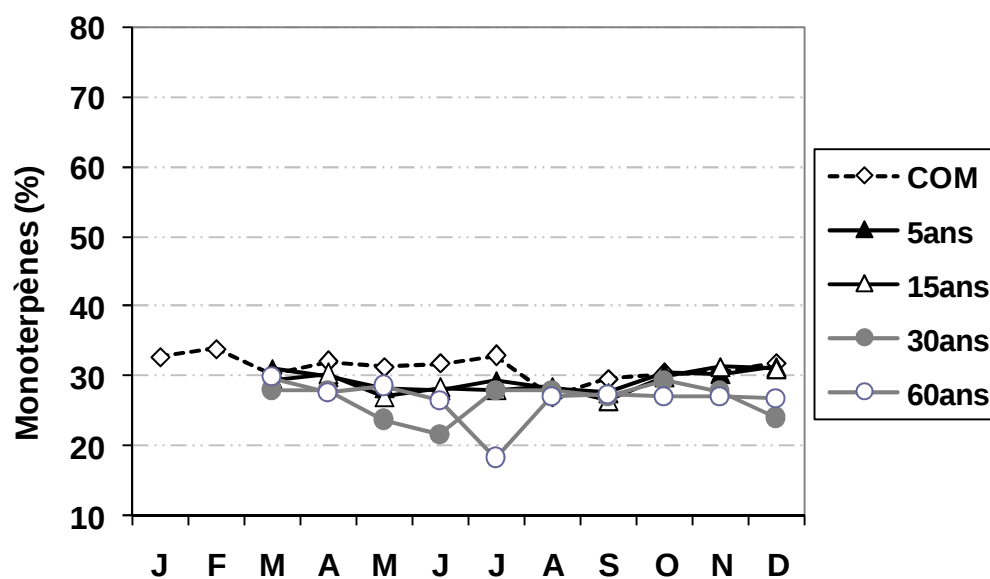


Figure 18: Variation annuelle de la teneur en monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux.

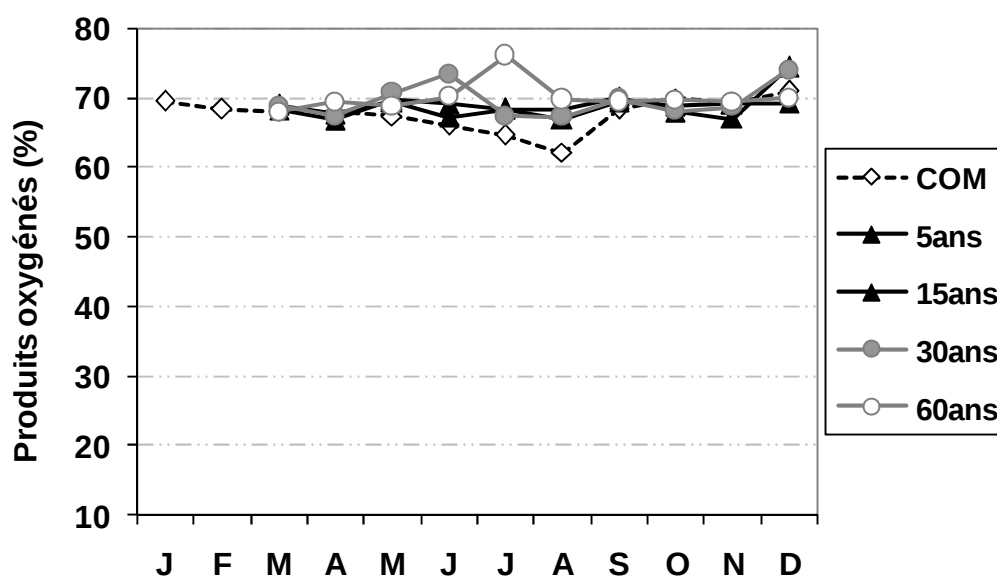


Figure 19: Variation annuelle de la teneur en produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux.

Cette variation significative est causée principalement par:

- La diminution de la teneur en 1,8-cinéole durant la saison sèche surtout de Juillet à Août avec des concentrations faibles de 53,70 et 52,07%, respectivement ;
- La teneur en α -terpinéol obtenue de Septembre à Janvier (57,75%) est supérieure à celle obtenue entre Mars et Août (55,36%) ;

Avec une concentration annuelle très faible de 0,07%, l'acétate de terpényle est absent au mois d'Août. Similairement, le trans-nerolidol disparaît entre Juillet et Décembre.

Le terpinène-4-ol et l' α -terpinéol varient peu au cours de l'année avec des teneurs moyennes de 2,11 et 7,93%, respectivement.

• L'huile essentielle expérimentale

La teneur relative des produits oxygénés dans les échantillons expérimentaux atteint un maximum au mois de Décembre (72,58%) et un minimum au mois de Mars (68,17%) (Tableau 5). La variation des composés chimiques majoritaires des produits oxygénés se manifeste comme suit :

- La teneur en 1,8-cinéole est maximale (72,58%) au mois de Décembre, diminue progressivement avant d'atteindre une valeur minimale au mois de Juillet (68,17%) ;
- La teneur en α -terpinéol est maximale (10,16%) en Juillet et minimale (6,67%) en Mars. Cette teneur maximale est relativement stable de Juin à Août comme l'est également la teneur minimale entre Octobre et Mars ;
- Le terpinène-4-ol varie peu au cours de l'année. Sa teneur moyenne entre Novembre et Mars est faible (1,80%) par rapport à celle calculée entre Avril et Octobre (2,16%);
- L'acétate terpényle disparaît au mois d'Août.

Chez les individus jeunes, la teneur en produits oxygénés varie peu au cours de l'année (~70%) (Figure 19). Par contre, chez les individus âgés, la teneur en produits oxygénés atteint un maximum durant les mois de Juin et Juillet (Figure 19).

❖ Les hydrocarbures sesquiterpéniques

• L'huile essentielle commerciale

Contrairement aux monoterpènes et produits oxygénés, la teneur en sesquiterpènes est minimale (3,10%) au mois d'Octobre avant d'atteindre un maximum (5,51%) au mois d'Août grâce à la teneur en santalène de 1,41%.

Tableau 5 : Variation mensuelle de la de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle expérimentale de ravintsara. Le LSD est déterminé avec un risque

Constituants	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc	LSD
HYDROCARBURES MONOTERPENIQUES											
tricyclène										0,13	
α-pinène	4,77	3,89	3,71	3,78	3,77	4,33	4,26	4,48	5,40	4,80	1, 21
α-thuyène	0,78	0,73	0,60	0,57	0,60	0,67	0,68	0,71	0,17		
camphène	0,15	0,24	0,13	0,12	0,16	0,22	0,15	0,16		0,14	
β-pinène	3,46	3,36	2,93	3,02	2,96	3,23	3,18	3,37	3,26	3,56	0, 85
sabinène	14,84	14,34	14,25	14,62	13,55	13,85	13,90	13,41	13,48	11,34	2, 17
β-myrcène	1,54	1,44	1,35	1,43	1,39	1,43	1,46	1,60	1,58	1,56	0, 18
α-phelladrène	0,18	0,23	0,70	0,03	0,04	0,25	0,05	0,65	0,09	1,25	
α-terpinène	0,86	0,75	0,72	0,68	0,65	0,72	0,84	0,81	0,85	0,70	
limonène	0,46	0,56	0,64	0,69	0,35	0,19	0,64	0,63	0,66	0,69	
β-phellandrène	0,68	0,71	0,63	0,48	0,67	0,56	0,65	0,69	0,92	0,91	
cis-β-ocimène	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,25	0,04	0,06	0,04	0,04	
γ-terpinène	1,36	1,23	1,23	1,19	1,12	0,99	1,37	1,32	1,33	1,26	0, 43
trans-β-ocimène	0,09	0,13	0,10	0,17	0,11	0,13	0,16	0,34	0,23	0,24	
p-cymène	0,08	0,12	0,10	0,07	0,09	0,14	0,10	0,06	0,05	0,12	
cubébène	0,27	0,36	0,49	0,44	0,44	0,41	0,32	0,19	0,14	0,36	
terpinolène	0,33	0,30	0,30	0,30	0,28	0,24	0,33	0,33	0,33	0,24	
α-compaène	0,22	0,17	0,05	0,05	0,20	0,09	0,04	0,12	0,19	0,09	
TOTAL	30,12	28,60	27,98	27,67	26,40	27,70	28,16	28,91	28,74	27,41	3, 50
PRODUITS OXYGENES											
1,8-cinéol	59,12	57,67	57,39	57,16	56,51	57,22	57,78	58,96	58,87	61,37	2, 53
linalool	0,09	0,05	0,08	0,04	0,04	0,09	0,10	0,03	0,14	0,18	
acétate de linalyle	0,07	0,12	0,13	0,11	0,12	0,12	0,13	0,08	0,08	0,07	0, 56
terpinène-4-ol	1,73	2,06	2,29	2,22	2,09	2,06	2,35	2,08	1,83	1,83	
acetate de térapényl	0,13	0,15	0,06	0,07	0,04	0,04	0,07	0,05		0,04	
α-terpinéol	6,67	8,74	8,93	9,72	10,16	9,01	8,95	7,02	7,04	7,87	2, 66
acétate de géranyle	0,20	0,22	0,46	0,35	0,18	0,28	0,46	0,29	0,22	0,63	
cis-nérolidol	0,04	0,05	0,31	0,08	0,24	0,11	0,04	0,05	0,12	0,29	
caryophyllène oxyde	0,07	0,09	0,10	0,08	0,09	0,09	0,08	0,06	0,06	0,06	
trans-nérolidol	0,06	0,06	0,05	0,14	0,06	0,07	0,03	0,06	0,16	0,25	
TOTAL	68,17	69,20	69,81	69,96	69,54	69,09	69,98	68,69	68,53	72,58	2, 73
HYDROCARBURES SESQUITERPENIQUES											
β-élémente	0,06	0,09	0,11	0,14	0,10	0,09	0,09	0,11	0,10	0,10	
β-caryophyllène	0,58	0,42	0,41	0,43	0,56	0,46	0,41	0,30	0,45	0,58	
caryophyllène oxyde	0,04	0,05	0,08	0,05	0,10	0,17	0,06	0,05	0,04	0,06	
α-humulène	0,58	0,78	0,81	0,82	0,83	0,64	0,77	0,54	0,66	0,51	
lédène	0,05	0,07	0,04	0,07	0,06	0,06	0,04				
β-sélinène	0,15	0,13	0,33	0,26	0,25	0,16	0,34	0,04	0,16	0,05	
α-murolène	0,15	0,05	0,03	0,10	0,17	0,08	0,05	0,19	0,22	0,49	
β-cadinène	0,12	0,31	0,21	0,29	0,15	0,42	0,37	0,21	0,23	0,03	
δ-cadinène	0,06	0,05	0,06	0,05	0,04	0,04	0,15	0,04	0,04	0,18	
TOTAL	1,79	1,96	2,08	2,22	2,26	2,12	2,28	1,48	1,90	2,00	0, 77
COMPOSES NON IDENTIFIES											
1	0,11	0,54	0,59	1,04	0,51	0,51		0,36	0,15	0,06	
2	0,04	0,16	0,03	0,15	0,23	0,10	0,14	0,05	0,28	0,30	
3	0,04	0,05	0,06	0,05	0,07	0,07	0,07	0,07	0,05	0,03	
4	0,05	0,06	0,08	0,05	0,07	0,04	0,09	0,12	0,06	0,03	
5	0,04	0,04	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	
6	0,05	0,08	0,08	0,09	0,08	0,05	0,04	0,03	0,06	0,13	
7	0,03	0,03	0,04	0,07	0,05	0,06	0,06	0,13	0,04		
8	0,02	0,04	0,06	0,06	0,07	0,05	0,04		0,03		
9	0,04	0,08	0,25	Trace	0,15	0,10	0,08	0,11	0,03		
10	0,72	0,58	0,80	0,81	0,81	0,60	0,74	0,69	0,12		
TOTAL	1,14	1,66	2,04	2,37	2,10	1,66	1,30	1,60	0,86	0,59	0, 96

- **L'huile essentielle expérimentale**

Une faible variation de la concentration en sesquiterpènes de 2,08 à 2,28% est notée entre Mai et Septembre, suivie d'une diminution brusque à 1,48% en Octobre grâce à la chute de la teneur de certains constituants chimiques tels que le β -caryophyllène, le β -sesilène, l' α -humulène et le δ -cadinène et la disparition de ledène. La teneur en sesquiterpènes varie peu entre Octobre et Avril (Tableau 5).

La figure 20 montre que le pourcentage relatif moyen des sesquiterpènes (2,28%) contenus dans les échantillons expérimentaux est nettement plus faible par rapport aux échantillons commerciaux (3,84%). Cependant, l'allure générale des courbes d'évolution est très comparable entre les deux types d'échantillons avec un pic caractéristique au mois de Juillet (expérimental) et Août (commercial). Chez les individus de 30 ans, ce pic apparaît plus précocement au mois de Mai.

❖ **Les composés non identifiés**

- **L'huile essentielle commerciale**

De nombreux composés non identifiés apparaissent au mois de Juillet et Août favorisant l'augmentation de leur teneur relative (2,68%) particulièrement à cause des composés n°5 et n°6.

- **L'huile essentielle expérimentale**

Avec une teneur moyenne de 1,63%, les composés non identifiés varient entre 0,56% et 2,37%, au cours de l'année. Ces composés présentent une teneur supérieure à 2% entre Mai et Juillet.

La teneur en composés non identifiés varie peu dans les échantillons provenant d'individus jeunes. Toutefois, une légère hausse d'environ 1% est notée entre les mois d'Avril et Juin. Chez les individus vieux, la teneur des composés non identifiés présente une hausse de 1-2% entre les mois d'Avril et Août (Figure 21).

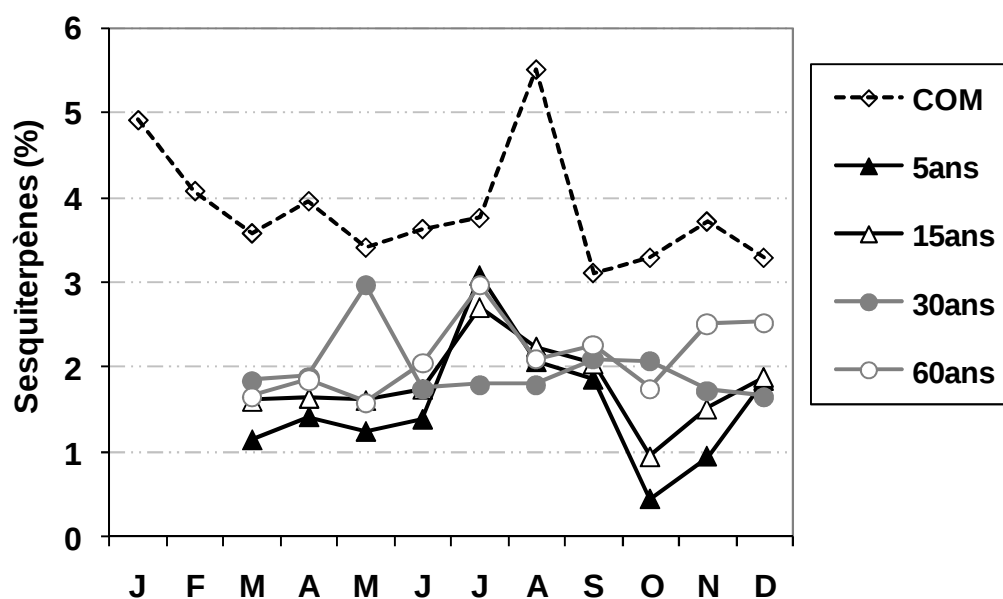


Figure 20: Variation annuelle de la teneur en sesquiterpènes de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux.

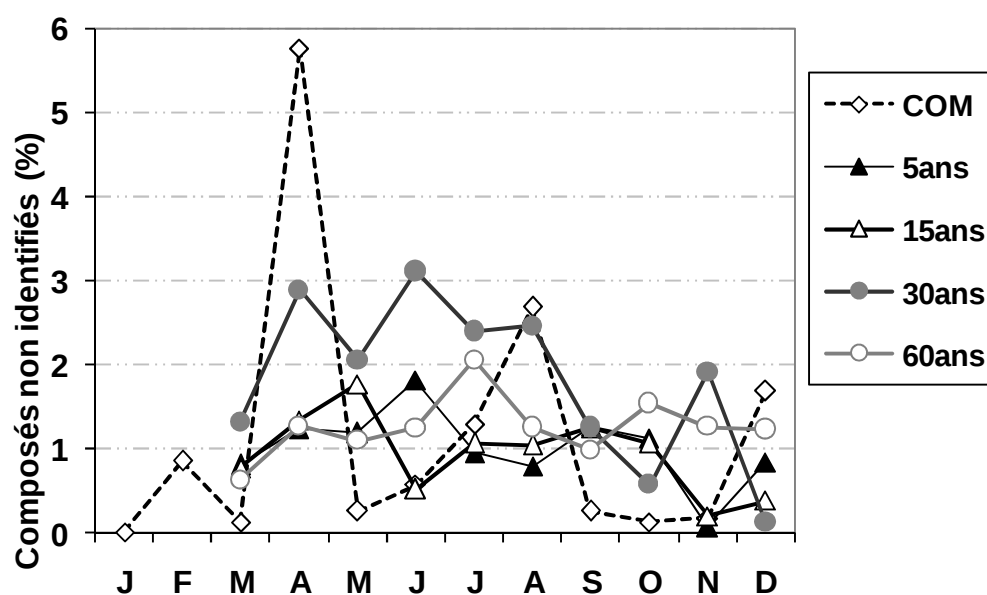


Figure 21: Variation annuelle de la teneur en composés non identifiés de l'huile essentielle de ravintsara pour des échantillons commerciaux (COM) et expérimentaux.

II.4 Composition chimique et la phénologie de la plante

Au cours de la présente étude, la variation de la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara est suivie en fonction de la phénologie de la plante. Les échantillons sont obtenus à partir de trois individus appartenant à trois classes d'âge définies:

- individus jeunes (5 et 15 ans),
- individus adultes (30 ans),
- individus vieux (60 ans).

❖ Les hydrocarbures monoterpéniques

D'une manière générale, la teneur en monoterpènes varie significativement pendant le cycle phénologique de la plante quel que soit l'individu considéré.

Les huiles essentielles obtenues à partir d'individus jeunes et adultes présentent des taux optimaux de monoterpènes, de 27,96 et 28,86%, respectivement, au moment de la croissance des feuilles (jeune) et de la floraison (adulte). Ces taux diminuent progressivement jusqu'à des teneurs minimales de 22,61 et 26,13%, au cours de la chute des feuilles (Tableau 6 et 7).

Tableau 6 : Variation de la teneur en monoterpènes, produits oxygénés, sesquiterpènes et composés non identifiés suivant la phénologie d'individus jeunes (5 et 15 ans). Pour chaque groupe, les teneurs moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)			
	Monoterpènes	Produits oxygénés	Sesquiterpènes	Non identifiés
Débourrement	28,27a	68,06a	1,99ab	1,45ab
Croissance	28,86a	68,72a	1,51b	0,96b
Feuillaison	27,99ab	69,21a	1,65ab	1,08ab
Chute des feuilles	26,13b	69,89a	2,06a	1,74a

Tableau 7 : Variation de la teneur en monoterpènes, produits oxygénés, sesquiterpènes et composés non identifiés suivant la phénologie d'individus adultes (30 ans). Pour chaque groupe, les teneurs moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)			
	Monoterpènes	Produits oxygénés	Sesquiterpènes	Non identifiés
Débourrement	27,93a	67,29a	1,79a	2,43a
Floraison	27,96a	68,82a	1,96a	1,24b
Fructification	26,62a	70,03b	1,79a	1,44b
Chute des feuilles	22,61b	72,05b	2,36b	2,58a

Pour l'huile essentielle extraite d'individus jeunes (5 et 15 ans), la teneur des constituants majoritaires des monoterpènes est optimale, au moment de la croissance des feuilles et minimale au moment de la chute des feuilles (Tableau 8). En ce qui concerne l'huile essentielle obtenue à partir d'individus adultes (30 ans), la teneur optimale des constituants majoritaires des monoterpènes est enregistrée au moment de la fructification (Tableau 9).

Tableau 8 : Variation des principaux constituants des monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus jeunes. Pour chaque composant, les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)				
	α -pinène	β -pinène	Sabinène	β -myrcène	γ -terpinène
Débourrement	4,53a	3,31a	14,40a	1,46a	1,01a
Croissance	4,82a	3,47a	14,47a	1,54a	1,25a
Feuillaison	4,51a	3,31a	13,94a	1,50a	1,27a
Chute des feuilles	3,54b	2,89b	13,50a	1,39b	1,17a

Tableau 9 : Variation des principaux constituants des monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus adultes (30 ans). Pour chaque composant, les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)				
	α -pinène	β -pinène	sabinène	β -myrcène	γ -terpinène
Débourrement	1,88a	2,21a	12,20b	1,20a	1,02a
Floraison	4,12b	3,29b	13,36a	1,46a	1,44a
Fructification	4,60b	4,03b	13,36a	1,52a	1,28a
Chute des feuilles	4,59b	3,31b	13,08a	1,46a	1,23a

Les monoterpènes extraits des feuilles de plantes plus âgées (60 ans) ont une tendance d'évolution particulière suivant la phénologie. En effet, la teneur en monoterpènes augmente très significativement de 22,62 à 28,76% entre la phase de débourrement des feuilles et la phase de fructification (Tableau 10). La proportion minimale des constituants majoritaires des monoterpènes est obtenue au moment du débourrement des feuilles. (Tableau 11).

Tableau 10 : Variation de la teneur en monoterpènes, produits oxygénés, sesquiterpènes et composés non identifiés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus vieux (60 ans). Pour chaque groupe de constituants, les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)			
	Monoterpènes	Produits oxygénés	Sesquiterpènes	Non identifiés
Débourrement	22,62a	72,93a	2,89a	1,79a
Floraison	27,16b	69,56b	2,59a	1,38ab
Fructification	28,76b	69,36b	2,10ab	1,13b
Chute des feuilles	27,52b	69,29ab	1,83b	1,20ab

Tableau 11 : Variation de la teneur des principaux constituants des monoterpènes de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus vieux (60 ans). Pour chaque composant, les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $p=0,05\%$.

Phénologie	Teneur relative (%)				
	α -pinène	β -pinène	sabinène	β -myrcène	γ -terpinène
Débourrement	2,89a	2,58a	11,67a	1,26a	1,13a
Floraison	4,16b	3,20a	12,44a	1,60b	1,75b
Fructification	4,94b	3,31a	13,67b	1,56ab	1,43ab
Chute des feuilles	4,37b	3,19a	14,07b	1,42a	1,29ab

❖ Les produits oxygénés

Chez les individus jeunes (5 et 15 ans), la teneur en produits oxygénés varie peu ou pas au cours du cycle phénologique (68,06 à 69,89%) (Tableau 6). La teneur en 1,8-cinéole ne varie pas quelque soit la phase de développement de l'individu. Par contre, les concentrations en terpinène-4-ol et α -terpinéol varient de manière significative dont la teneur maximale est enregistrée au moment de la chute des feuilles (Tableau 12).

Tableau 12 : Variation de la teneur des principaux constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus jeunes (5 et 15 ans). Pour chaque composant, les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha =0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)		
	1,8-cinéole	terpinène-4-ol	α -terpinéol
Débourrement	57,40a	1,91a	8,37a
Croissance	58,74a	1,93a	7,35a
Feuillaison	58,96a	1,85a	7,84a
Chute des feuilles	57,15a	2,29b	9,67b

Concernant les individus adultes (30 ans), la teneur en produits oxygénés augmente de 67,2 à 72,05% entre la période de débourrement et la chute des feuilles (Tableau 7). La teneur en 1,8-cinéole est minimale (55,54%) au moment du débourrement des feuilles, puis se stabilise autour de 58% lors de la floraison, la fructification et la chute des feuilles. A l'opposé, l' α -terpinéol présente une teneur maximale (11,17%) au moment de la chute des feuilles avant de se stabiliser autour de 8,65%, au cours des phases suivantes. La teneur en terpinène-4-ol varie peu au cours du cycle phénologique de ces individus adultes (Tableau 13).

Tableau 13 : Variation de la teneur des principaux constituants des produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus adultes (30 ans). Pour chaque composant, les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha = 0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)		
	1,8-cinéole	terpinène-4-ol	α -terpinéol
Débourrement	55,54a	2,21a	9,08a
Floraison	57,53b	2,22a	8,40a
Fructification	58,84b	2,04a	8,46a
Chute des feuilles	57,37b	2,53a	11,17b

Chez les individus vieux (60 ans), la teneur en produits oxygénés diminue de manière significative de 72,93 à 69,29% entre les phases de débourrement et de chute des feuilles (Tableau 10). La concentration en 1,8-cinéole augmente significativement de 56,60 à 58,52% entre le débourrement des feuilles et la fructification. Par contre, la teneur maximale en α -terpinéol (12,63%) est atteinte au moment du débourrement des feuilles, et la valeur minimale (7,66%) au moment de la fructification. La teneur en terpinène-4-ol ne varie pas au cours du cycle phénologique des individus (Tableau 14).

Tableau 14 : Variation de la teneur des constituants majoritaires des produits oxygénés de l'huile essentielle de ravintsara suivant la phénologie des individus vieux (60 ans). Pour chaque composant, les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité $\alpha=0,05$.

Phénologie	Teneur relative (%)		
	1,8-cinéole	terpinène-4-ol	α -terpinéol
Débourrement	56,60b	2,55a	12,63a
Floraison	57,65ab	2,67a	8,33b
Fructification	58,52a	2,09a	7,66b
Chute des feuilles	58,12a	2,13a	8,42b

❖ Les hydrocarbures sesquiterpéniques

Chez les individus jeunes (5 et 15 ans) et adultes (30 ans), la teneur maximale en sesquiterpènes (2,06 et 2,36%) est enregistrée au moment de la chute des feuilles alors que la teneur minimale (1,51 et 1,79%) est notée au cours de la croissance des feuilles (jeunes) ou de la floraison (adultes) (Tableaux 6 et 7). Par contre, chez les individus vieux (60 ans), une diminution progressive (2,89 à 1,83%) de la teneur en sesquiterpènes est remarquée entre la phase de débourrement et la chute des feuilles (Tableau 10).

❖ Les constituants non identifiés

La teneur des composés non identifiés dans l'huile essentielle des individus jeunes et adultes est optimale (2,58 et 1,74 %) pendant la chute des feuilles. Ensuite, cette teneur diminue de manière significative pour atteindre une valeur minimale (1,24 et 0,96%) au moment de la floraison (Tableaux 6 et 7). Chez les individus âgés, la concentration des composés non identifiés est faible (1,13%) au moment de la fructification et optimale (1,79%) lors du débourrement des feuilles (Tableau 6).

DISCUSSIONS

Variation du rendement en huile essentielle de ravintsara

Au cours de ce travail, les extractions d'huiles essentielles à partir de feuilles de ravintsara ont donné des rendements compris entre 0,80 et 1,95%. Ces résultats confirment ceux de Ranarivelo (2006) rapportant des rendements variant entre 0,7 et 1,8%.

Le rendement en huile essentielle de ravintsara apparaît largement supérieur à ceux obtenus à partir de feuilles d'autres plantes comme *Helichrysum bacteiferum* (0,3%), *Helichrysum gymnocephalum* (0,5%), *Pelargonium roseum* (0,5%), *Cymbopogon citratus* (0,2%) (Rabehaja, 2007). Cependant, le rendement en huile essentielle de ravintsara est inférieur à celui obtenu à partir de feuilles de *Ravensara aromatica* pouvant atteindre 1,92 à 2,22% (Razafimamonjison, 2004).

Variation du rendement en fonction de l'âge ontogénique de la feuille

La production d'huile essentielle est influencée par le stade de développement de la feuille. Nous montrons que l'accumulation d'huile essentielle augmente au cours de la croissance des feuilles, atteint un optimum dans les feuilles matures puis diminue au fur et à mesure que les feuilles vieillissent. Le changement de la quantité de chlorophylles au cours du développement de la feuille pourrait être une des causes principales de cette variation du rendement en huile essentielle (Jun-Wen et al., 2007) par ce que, la biosynthèse des huiles essentielles, constituées principalement de métabolites secondaires, est dépendante de la photosynthèse (Ranwala et al., 1998 ; Dubey et al., 2003). En effet, les feuilles riches en chlorophylles (stade 2 et stade 3) accumulent une quantité plus importante d'huile essentielle par rapport aux feuilles dont la fonction chlorophyllienne n'est pas optimale, comme les feuilles juste débourrées (stade1) et sénescents (stade 5).

Des résultats similaires ont été rapportés par de nombreux auteurs sur d'autres espèces. Chez les feuilles de *Mentha piperta*, le rendement en huile essentielle diminue quand les feuilles vieillissent (Marie et al., 2000). Chez *Salvia officinale*, les glandes à huiles essentielles présentes chez les feuilles en croissance ou matures sont plus nombreuses que celles trouvées chez les feuilles très jeunes et sénescents (Croteau et al.,1998). Cette tendance à la diminution de la production d'huile essentielle avec le vieillissement de la feuille est vérifiée chez *Pelargonium* (Rajeswara, 1996 ; Motsa, 2006).

Certains métabolites tels que les stérols et les acides gras sont optimales au cours de l'expansion de la feuille et diminuent lors de la sénescence chez *Cantharantus roseus* (Mishra et al., 2007).

Variation du rendement en fonction de l'âge chronologique de la plante

La présente étude montre que le rendement en huile essentielle de ravintsara diminue progressivement de 1,73 à 0,94% entre les individus de 5 et 60 ans. Cette variation est identique à celle rapportée par Ranarivelo (2006) qui a trouvé que les individus de ravintsara âgés de 5 ans produisent plus d'huile essentielle que les individus de 15 ans. Amiri (2006) a montré que la production d'huile diminue avec l'âge de la plante chez *Salvia bracteata*. Cette diminution du rendement avec l'âge pourrait être due au vieillissement des organes de la plante où se déroule la biosynthèse des huiles essentielles. En effet, les activités physiologiques comme la photosynthèse et la synthèse des métabolites secondaires pourraient être ralenties au cours de la sénescence.

Variation du rendement en fonction de la saison

Le suivi de la variation du rendement au cours de l'année montre que la production en huile essentielle de ravintsara est faible d'Avril à Septembre et devient importante d'Octobre à Mars. Cette augmentation du rendement coïncide avec l'abondance de feuilles au stade mature sur l'arbre, pendant la saison humide, par contre, au cours de la saison sèche, les feuilles sont en majorité sénescentes ou très jeunes. Cette augmentation du rendement au cours de la saison humide pourrait résulter d'une accélération des activités physiologiques puisqu'à ce moment, la surface foliaire, la quantité de chlorophylles, la température et l'humidité semblent être favorables à toutes les activités physiologiques contrôlant la biosynthèses des huiles essentielles (Langton et al., 2003). Par opposition, la chute de la température et l'absence de pluies seraient les causes de la diminution du rendement pendant la saison sèche parce que le déficit hydrique perturbe la capacité à la photosynthèse (Sarker et al., 2005). Le déficit hydrique entraîne une diminution de la production d'huile essentielle chez *Rosmarinus officinalis* (Singh et Ramesh, 2002), chez *Pimpinella anisum* (Zehtab-Salmasi et al., 2001). Motsa (2006) a rapporté que le rendement en huile essentielle de géranium est élevé au printemps/été et faible à l'automne/hiver. Cependant, Razafimamonjison (2004) a constaté que le rendement en huile essentielle de *Ravensara aromatica* est plus élevé (2,22%) au cours de la saison humide (Mars à Août) comparé au rendement obtenu (1,92%) durant la saison très humide (Septembre à Février). La différence du macroclimat entre les hauts-plateaux où l'on trouve les pieds de ravintsara pris en compte dans le cadre de notre étude et celui de la côte Est où les *Ravensara* poussent, pourrait être à l'origine de cette inversion de la tendance.

Variation du rendement en fonction de la phénologie

Le rendement en huile essentielle de ravintsara varie en fonction de la phénologie de la plante. Nos résultats indiquent que la reproduction de la plante (floraison et fructification) perturbe la synthèse et l'accumulation de l'huile essentielle dans les feuilles de ravintsara.

Notre étude montre que les feuilles de ravintsara récoltées au moment de la fructification donnent un rendement élevé. Par contre, durant la période de débourrement des feuilles, la production d'huile est très faible. Il est possible que l'augmentation du rendement durant la fructification soit due à une interaction entre l'abondance des pluies et la pleine maturité des feuilles. Rao et al. (2002) et Weiss (1997) ont montré que la production en huile essentielle est élevée durant la période de préfloraison, très forte au moment de la floraison et de la fructification. Cependant, Amiri et al. (2006) ont montré que le rendement est élevé (0,57%) au moment de la préfloraison et faible (0,2%) en post floraison chez *Salvia bracteata*.

Variation de la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara

Comme le rendement, la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara varie également avec l'âge chronologique, l'âge ontogénique de la feuille et la phénologie de la plante.

Variation de la composition chimique en fonction de l'âge ontogénique de la feuille

Au cours du développement de la feuille, la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara subit une variation. Les feuilles matures apparaissent comme étant les plus riches en monoterpènes (29,64%) alors que les feuilles sénescents présentent une teneur plus faible (26,35%). Une étude réalisée sur les feuilles de menthe a montré que la proportion de monoterpènes est maximale lorsqu'elles sont matures entre 12 à 20 jours. A partir de cette phase, un déclin rapide de la teneur a été constaté (Marie et al., 2000).

Les teneurs des monoterpènes majoritaires dans l'huile de ravintsara tels que l' α -pinène, le β -pinène et le β -myrcène diminuent au cours du développement de la feuille tandis que la teneur en sabinène augmente. Cependant, une augmentation de la teneur en composés monoterpéniques a été constaté dans l'huile essentielle de menthe (Marie et al., 2000).

Toutefois, les proportions de limonène et de menthone semblent être importantes dans les feuilles jeunes en pleine expansion. Jun-Wen et al. (2007) ont montré aussi que les teneurs en α -pinène, β -pinène, sabinène et monoterpènes totaux diminuent avec le développement de la feuille chez *Hevea brasiliensis*.

La concentration des produits oxygénés dans les feuilles de ravintsara est aussi affectée par le stade de développement de la feuille. Notre étude a confirmé que ce groupe présente un pourcentage relatif maximal dans les feuilles matures, ce qui pourrait provenir de l'augmentation de la concentration en 1,8-cinéole dans cet organe. Cette variation de la teneur en 1,8-cinéole diffère sensiblement des résultats observés chez la menthe (Marie et al., 2000). En effet, la teneur en 1,8-cinéole dans les feuilles de menthe augmente avec l'âge ontogénique de la feuille devenant maximale au cours de la sénescence.

Chez le ravintsara, la teneur en terpinène-4-ol diminue avant d'atteindre une teneur minimale dans les feuilles de stade 4. Par contre, l' α -terpinéol varie en sens inverse présentant une teneur maximale lorsque les feuilles deviennent sénescentes. Ceci suggère que la biosynthèse de ces deux composés serait étroitement liée. La dégradation de terpinène-4-ol semble favoriser la synthèse de l' α -terpinéol.

Variation de la composition chimique en fonction de l'âge chronologique de la plante

La composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara varie de façon significative, au cours de l'année. D'abord, cette variation est marquée par la diminution de la proportion des monoterpènes durant la saison sèche d'Avril à Août et par une augmentation durant la période de pluie d'Octobre à Février. Plus précisément, la concentration des constituants majoritaires des monoterpènes comme l' α -pinène, le β -pinène et la sabinène est minimale au mois d'Août.

Les composés monoterpéniques possèdent une structure insaturée qui pourrait être détruite par les réactions d'oxydation. Ces derniers pourraient être favorisées par les paramètres climatiques tels que la température, la pluviométrie et l'ensoleillement (Weiss, 1997; Murtagh, 1996 ; Kemar et al., 2001; Petropoulos et al. 2007). Nos résultats diffèrent sensiblement de ceux obtenus chez *Ravensara aromatica* pour laquelle, la teneur en α -pinène, β -pinène et sabinène est faible pendant la saison perhumide de Septembre à Janvier tandis que celle du méthyl-chavicol et du limonène a augmenté (Raobelison, 2004; Razafimamonjison, 2005).

La teneur en produits oxygénés durant la période de pluie est supérieure à celle obtenue au cours de la saison sèche durant laquelle le taux de 1,8-cinéole est faible. Ceci confirme les résultats obtenus sur la variation saisonnière de l'huile essentielle de ravintsara montrant une forte teneur en 1,8-cinéole de Septembre à Janvier et faible de Février à Octobre. La proportion de terpinène-4-ol et celle de l' α -terpinéol varient peu au cours de ces périodes (Raobelison, 2004 ; Ranarivelo, 2006).

Variation de la composition chimique en fonction de la phénologie de la plante

Les constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara varient au cours du cycle phénologique de la plante. D'après nos résultats, le taux des monoterpènes est maximum au moment de la floraison des individus adultes (30 ans) ou au cours de l'expansion des feuilles pour les individus jeunes (≤ 15 ans) ; la proportion de ces composés diminue lors de la chute des feuilles. Par contre, chez les arbres plus âgés ou vieux, la teneur maximale en monoterpènes n'est obtenue que lors de la phase de fructification et celle minimale n'est enregistrée que durant le débourrement des feuilles

Le décalage entre l'activité physiologique des plantes jeunes, adultes et sénescents pourrait être la cause des différences observées sur la teneur des constituants chimiques. Les individus jeunes pourraient avoir une activité physiologique plus intense que les individus âgés. En effet, il est observé que la teneur maximale des différents constituants chimiques chez les jeunes individus est souvent enregistrée une phase plus tôt par rapport à celle des plantes sénescents. La teneur maximale de l'ensemble des sesquiterpènes dans l'huile essentielle extraite à partir d'individus jeunes et matures est obtenue au moment de la chute des feuilles pendant laquelle la majorité des feuilles présentes sur l'arbre est sénescence.

De nombreux travaux antérieurs ont confirmé l'influence de la phénologie sur la composition chimique des huiles essentielles. Les études effectuées sur *Salvia* ont montré que la teneur en monoterpènes est maximale durant la période de floraison et celle des sesquiterpènes est élevée au cours de la fructification (Pitarokili et al., 2006 ; Liu et al., 2006 ; Amiri, 2006). Une étude portée sur la variation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a confirmé aussi que la concentration en pulegone est faible tandis que celle de menthone est élevée pendant la période de pleine floraison. Ce sont les composés majeurs qui déterminent la qualité de l'huile de *Mentha pulegium* (Farooqi, 1999).

Huiles essentielles expérimentales et huiles essentielles commerciales

Au cours de l'année, la composition chimique de l'huile essentielle commerciale a été comparée avec celles des huiles expérimentales provenant d'individus d'âges différents. Chez l'huile essentielle commerciale, la teneur en monoterpènes, particulièrement l' α -pinène, le β -pinène et la sabinène, et celle des produits oxygénés surtout le 1,8-cinéole sont généralement plus faibles durant la saison sèche et élevées durant la saison humide. Ce profil est proche de celui trouvé chez l'huile essentielle provenant d'individus jeunes de 5 et 15 ans, mais assez éloigné des profils obtenus chez les individus adultes (plus de 30 ans). Ces résultats suggèrent que, les huiles essentielles écoulées sur le marché proviendraient principalement de jeunes plantations. Ainsi, il apparaît que les analyses des échantillons commerciaux sont effectuées au cours du mois d'extraction et que les opérateurs font peu ou pas d'adultération en mélangeant des huiles obtenues à différentes périodes de l'année.

Ces résultats indiquent également que les opérateurs ne font pas de rétention de stock d'huile dans la mesure où les fluctuations mensuelles de la composition chimique observées avec les échantillons expérimentaux suivent étroitement celles des échantillons commerciaux. Ces observations sont en accord avec la forte demande en huile de ravintsara sur le marché.

Un autre résultat surprenant est la différence importante entre les teneurs moyennes en sesquiterpènes dans les échantillons expérimentaux (2,28%) et dans l'huile commerciale (3,84%). Ceci pourrait provenir des différences au niveau des techniques de distillation utilisées. En effet, les huiles essentielles commercialisées sont obtenues par distillation dans un alambic d'un grand volume tandis que les huiles essentielles expérimentales ont été extraites sous pression dans une cocotte minute. Les sesquiterpènes sont des composés très instables à température élevée, le mode opératoire au laboratoire pourrait favoriser leur dégradation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A la suite de ce travail, nous pouvons dire que le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara varient en fonction de l'âge ontogénique de la feuille, de l'âge chronologique de la plante, de la saison ainsi que de la phénologie de la plante.

Les feuilles provenant des individus jeunes de ravintsara donnent un rendement en huile essentielle plus élevé que les feuilles récoltées sur les individus âgés. Les feuilles matures en fin de croissance synthétisent et accumulent plus d'huiles essentielles que les feuilles jeunes et sénescents. Aussi, le rendement en huile essentielle de ravintsara est maximal au cours de la saison humide d'Octobre à Mars durant laquelle la plupart des feuilles sont matures ; les individus jeunes sont en pleine feuillaison alors que les individus âgés sont en phase de fructification.

Il découle du présent travail que les huiles extraites de feuilles matures sont riches en sabinène et en 1,8-cinéole. Ce sont des composés marqueurs de la qualité de l'huile essentielle de ravintsara. Il est donc raisonnable de ne pas exclure les feuilles sénescents du lot de feuilles destinées à l'extraction.

Ce travail montre également que, suivant l'âge chronologique de la plante, l'huile essentielle de ravintsara extraite à partir de feuilles d'individus jeunes est riche en monoterpènes (α -pinène, β -pinène, β -myrcène et sabinène). Par ailleurs, la teneur en 1-8-cinéole diminue légèrement avec l'âge. Il est généralement accepté, cependant, que ces composés monoterpéniques déterminent la qualité de l'huile essentielle de ravintsara destinée au marché comme l'est le 1-8-cinéole. Enfin, les feuilles récoltées au cours de la saison de pluies d'Octobre à Mars sont riches en α -pinène, β -pinène, sabinène et en 1,8-cinéole comparées aux feuilles collectées durant la saison sèche d'Avril à Août.

Par conséquent, nous pouvons proposer qu'au niveau de la composition chimique, les individus jeunes donnent une huile essentielle de qualité supérieure, et que la meilleure saison de récolte correspond à la période de pluies allant d'Octobre à Mars.

Il serait donc intéressant pour les opérateurs en huile essentielle de prolonger la phase juvénile des individus destinés à la production afin d'obtenir un rendement élevé et une huile de bonne qualité. Ce rajeunissement est possible en taillant les arbres de façon régulière. Cependant, les individus matures devraient être laissés intacts pour permettre la production de graines destinées à la pépinière.

Les individus récoltés entre Octobre et Mars arrivent à régénérer, au moins partiellement, le nombre total de feuilles initiales avant la coupe, au bout de 6 mois (Rasendramiadana, données non-publiées). Ce qui suggère qu'une seconde saison de récolte est possible vers le mois d'Avril. Cependant, la capacité de régénération des feuilles dépend de plusieurs paramètres dont les plus importants sont l'intensité de la coupe (combien de feuilles doit-on laisser sur l'arbre ?), la période de coupe et l'âge de l'individu.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 2000.** Recueil des Normes Francaises Huiles Essentielles, tome 2, vol 1, 79-86.
- Aloni, B., Karni, L., Zaidman, Z. et Schaffer, A.A., 1997.** The relationship between sucrose supply, sucrose-cleaving enzymes and flower abortion in pepper. *Ann. Bot.* 79:601-605.
- Amiri, H., 2007.** Quantitative and qualitative changes of essential oil of *Salvia bracteata* Bank et Sol. in different growth stages. *Daru* 15(2):79-83.
- Andrianaivoravelona, J.O., 2007.** Analyse de la composition chimique de quelques huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse et spectroscopie de masse. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Ecole Supérieure Polytechnique- Filière Génie Chimique, Université d'Antananarivo. 71p.
- Andrianjafinandasana, S.N., 2008.** Evaluation des propriétés allélopathique de *Ravensara aromatica* Sonnerat (Lauraceae). Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Option Physiologie Végétale, Université d'Antananarivo. 73p.
- Andrianoelisoa, H.S.H.N., 2008.** Etude de la variabilité des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* Sonnerat : prescription pour une gestion durable de cette espèce endémique malgache. Doctorat en Sciences Chimiques, Université de Montpellier II. 235p.
- Asawalam, E.F., 2006.** Insecticidal and repellent properties of *Piper guineense* seed oil extract for the control of *Zea mais* weevil, *Sitophilus zeamais*. *Elec. J. Environ. Agric. Food. Chem.* 5(3):1389-1394.
- Asawalam, E.F., Emosairue, S.O. et Hassanali, A., 2006.** Bioactivity of *Xylopi aetiopica*, Dunal, A. rich essential oil constituents on maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky, Coleoptera: CURCULIONIDAE, *Elec. J. Environ. Agric. Food. Chem.* 5(1):1195-1204.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della, L.R., Tubaro, A., Simonovska, B.O, Krasna, A. et Zupani,c A., 2001.** Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 75:125-132.
- Berha, O. et Rakotoarison, C., 2005.** Les huiles essentielles de Madagascar, Publication de Aroma Forest

- Blanchard, J., 2007.** *Cinnamomum camphora* à cinéole, ravintsara,, une plante au service de la prévention des infections nosocomiales en milieu hospitalier. *Phytothérapie* 5(1):15-20.
- Bosabalidis, A.M., 2002.** Structural features of *Origanum* sp. In: Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles, Kintzios S.E., ed., Oregano.Taylor and Francis, London. 25:11-64
- Chalot, C., 2001,** La culture des plantes à parfums dans les colonies françaises. *Agronomie Coloniale* 1927:112-105.
- Chiasson, H., Belanger, A., Bostanian, N., Vincent, C. et Poliquin, A., 2001.** Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare*, Asteraceae, essential oils obtained by three methods of extraction. *Econ. Entom.* 94(1): 167-171.
- Daizy, R., Batish., Harminder, P., Singh., Nidhi, S., Shalinder, K. et Ravinder, K.K., 2006.** Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Naturforsch.* 61:465-471.
- De Laurentis, N., Rosato, A., Gallo, L., Leone, L. et Milillo, M.A., 2005.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*. *Food Chemistry.* 39:3-8.
- Domaracký, M., Rehák, P., Juhás, Š. et Koppel, J., 2007.** Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos *in vivo*. *Physiol. Res.* 56: 97-104.
- Dubey, V.S., Bhalla, R. et Luthra, R., 2003.** Sucrose mobilization in relation to essential oil biogenesis during palmarose, *Cymbopogon martinü* Roxb Wats. var motia, inflorescence development. *Bioscience* 28(4):479-487.
- Eisenreich, W., Sanger, S., Zenk, M.H., et Bacher, A., 1997.** Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Lett.* 38:3889-3892.
- Farooqi, A.H.A., Sangwan, N.S. et Swangwan, R.S., 1999.** Effect of different photoperiodic regime on growth, flowering and essential oil in *Mentha species*. *Plant Growth Reg.* 29:181-187.
- Farreyrol, K., 1997.** Etude de quatre plantes médicinales à huiles essentielles de l'île de la Réunion. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies : Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse, Filière : Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse. 97p.
- Gershenzon, J. et Croteau, R., 1993.** Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpènes. In: *Lipid metabolism in plants*. TS Moore, Jr. (ed),CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp 339-388.

- Gershenzon, J., Mc Caskill, D., Rajaonarivony, J.I.M., Mihailiak, C., Karp, F. et Croteau, R., 1992.** Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Anal. Biochem.* 200:130-138.
- Gershenzon, J., Mcconkecs, M.E. et Croteau, R.B., 2000.** Regulation of monoterpenes accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 122:205-213.
- INSTAT/DES / SSES : Bulletin trimestriel n°1-Mai 2004.**
- Jun-Wen, C.Æ et Kun-Fang, C., 2007.** Changes in activities of antioxidative system and monoterpene and photochemical efficiency during seasonal leaf senescence in *Hevea brasiliensis* trees. *Acta Physiol. Plant.* DOI 10.1007/s11738-007-0070-1
- Koechlin, J., Guillaumet, J.L. et Mora, T.P., 1974.** Flore et végétation de Madagascar 687p.
- Konnings, G.H., Agyare, C. et Ennison, B., 2004.** Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia.* 75(1):65–67.
- Kouninki, H., Haubruge, E., Noudjou, F.E., Lognay, G., Malaisse, F., Ngassoum, M. B., Goudoum, A., Mapongmetsem, P. M., Ngamo, L. S. et Hance, T., 2005.** Potential use of essential oils from Cameroon applied as fumigant or contact insecticides against *Sitophilus zeamais* Motsch., *Coleoptera: Curculionidae*,. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70(4):787–792.
- Kumar, S., Bahl, J.R., Bansal, R.P. et Naqvi, A. A., 2001.** Methode of annual cropping of *Pelargonium graveolens* for rose-scented geranium essential oil in subtropical agroclimates. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76:183-196.
- Lamaty, G. Menut, C. Molangui, T. Valade, I. Rasoanaivo, P. et Petitjean, A., 1993.** Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques malgaches. Proceedings of the 5th NAPRECA Symposium; Sept. 19-23. Antananarivo. 61p.
- Lange, M.B., Wildung R.M., Stauber, E.J., Sanchez, C., Pouchnik, D. and Croteau, R., 2007.** Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from the mint glandular trichomes. *PNAS* 97(6):2934-2939
- Langton, F.A., Adams, S.R. et Cockhull, K.E., 2003.** Effets of photoperiod on leaf greenness of four bedding plant species. *J. Hort. Sci. Biotech.* 78(3):400-404.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A. et Rohmer, M., 1997.** Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS. Lett.* 400:271–274.

- Liu, J., Nan, P., Tsering, O., Tsering, T., Bai, Z., Wang, L., Liu, Z., Zhong, Y., 2006.** Volatile constituents of the leaves and flowers of *Salvia przewalskii* Maxim. from Tibet. *Flav. Fragr. J.* 21(3):435-438.
- Loreto, F, Pinelli, P, Manes, F, Kollist, H, 2004.** Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiol.* 24:361–367.
- Mahmoud, S. S. et Croteau, R., 2002.** Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7:366–373.
- Marie, E., McConkey, Gershenzon, J. et Croteau, R. B, 2000.** Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* 122:215–223.
- McCaskill, D.G. et Croteau R., 1999.** Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Tetrahedron Lett.* 40:653-656.
- Mishra, S., Tyagi, A., Singh, I.V. et Sangwan, R. S., 2007.** Changes in lipid profile during growth and senescence of *Cantharatus roseus* leaf. *Plant Physiol.* 18(4):447-454.
- Morone-Fortunato, I. et Avato, P., 2008.** Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. hirtum, Linq, Ietswaart. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*
- Motsa, N.M., 2006.** Essential oil and composition of rose scented geranium, *Pelargonium* sp, as influenced by harvesting frequency and plant shoot age. MSc. Agric, Agronomy, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, 96p.
- Murtagh, G.J. et Smith, G.R., 1996.** Month of harvest and yield components of tea tree II: oil concentration, composition and yield. *Aust. J. Agric. Res.* 47:817-827.
- Ohno, T., Kita M., Ymauka, Imamura S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S. et Kodama, T., 2003.** Antimicrobial oils against. *Helicobacter pylori*, *Helicobacter* 8(3):207-215.
- Penoel, P. et Francomme, P., 2001.** L’aromathérapie exactement. In : Encyclopédie de l’utilisation des huiles essentielles, Roger Jollois (ed.), Paris.
- Penuelas, J. et Munne-Bosch, S., 2005.** Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci.* 10:166–169.
- Petropoulos, S.A., Daferera D., Polissiou, M.G. et Passam, H.C., 2008.** The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Sci. Hort.* 115:393–397.

- Pitarokili, D., Tzakou, O. et Loukis, A., 2006.** Essential oil composition of *Salvia verticillata*, *S. verbenaca*, *S. glutinosa* and *S. candidissima* growing wild in Greece. *Flav. Fragr. J.* 21(4):670-673.
- Pronabio-Sypeam, 2001.** Projet de normes pour l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora* de Madagascar. (Label Nator.).
- Rabehaja, R.D.J., 2007.** Contribution à la valorisation de *Cymbopogon giganteus*, Chiov., *madagascariensis*, (A. Camus). Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies : Ecole Supérieure Polytechnique, Filière Génie Chimique, Université d'Antananarivo, 79p.
- Raharivelomanana, P.J., 1988.** Contribution à l'étude des huiles essentielles de *Laurus nobilis*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Ravensara anisata*, Lauracées, -Composition chimique - inhibition microbienne. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Option Physiologie Végétale, Université d'Antananarivo, 69p.
- Rajeswara, R.B.R., Kaul P.N., Mallavarapu, G.R. et Ramesh, S., 1996.** Effect of seasonal climatic change of rose scented geranium *Pelargonium* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 24:627-635.
- Rakotovao, L.H. et Randrianjoary, E., 1996.** Origine et repartition bioécologique des plantes aromatiques de Madagascar. In: Biogeography of Madagascar, Lourenco W. R. (ed.), Editions ORSTOM, Paris, 187p.
- Ramamonjisoa, V.V.H.S., 2004.** Multiplication in vitro de *Cinnamomum camphora*, L, Nees & Eberm ou Ravintsara (Lauraceae). Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Option Physiologie végétale, Université d'Antananarivo. 48p.
- Ramanoelina, P.A.R. et Rasoarahona, J.R.E., 2006.** Chemical composition of *Ravensara aromatica* Sonn. leaf essential oils from Madagascar. *J. Essent. Oil Res.* 18:215-217.
- Ranarivelo Ranaivoarisoa, L., 1997.** L'huile essentielle et leurs constituants chimiques : le Ravintsara, *SYPEAN News Letter* 12:8- 4.
- Ranarivelo Ranaivoarisoa, L., 2006.** Contribution à la différenciation des huiles essentielles de ravintsara : *Cinnamomum camphora*, L. Nees & Eberm et *Ravensara aromatica* Sonnerat de Madagascar. Mémoire d'ingénieur, Ecole supérieure Polytechnique d'Antananarivo, 123p.
- Randevoson, M.N.M., 2004.** Contribution à la réalisation de la pharmacopée malagasy. Monographie de *Calophyllum inophyllum*, *Cedrelopsis grevei*, *Cinnamomum camphora* et *Ravensara aromatica*. Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 128p.

- Randriatsinanariana, G.R., 2007.** Etude du vieillissement de l'huile essentielle de *Cinnamomum campora*, Ravintsara, en vue de la détermination du délai de péremption. Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département: Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 89p.
- Rangahau, M.K., 2001.** Essential oils and their production, New Zealand Institute for Crops Food Research LTD. 4p.
- Ranwala, A.P. et Miller W.B., 1998.** Sucrose-cleaving enzymes and carbohydrate pools in *Lilium longiflorum* floral organs. *Physiol. Plant.* 103:541–550.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P. et Watkins, C.B., 1997.** Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes: salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiol.* 155:137–149.
- Raobelison, F., 2004.** Contribution à l'étude de la variabilité qualitative et la quantitative d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* dans la région de Betanimainty. Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département: Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 152p.
- Raoelimanana, H.L., 1996.** Contribution à la valorisation des huiles essentielles de Madagascar et leur utilisation en cosmétique. Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département: Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 89p.
- Ratsimanohatra, B., 2001.** Contribution à l'étude de la variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Helichrysum gymnocephalus* par analyse des résultats statistiques, Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département : Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 90p.
- Ravoninahitra, R.H., 2005.** Contribution à l'étude de la variabilité de la composition chimique d'huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* dans la région Ouest de Madagascar, Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département : Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 62p.
- Razafimamonjison, M.M., 2004.** Contribution à l'étude de la variation saisonnière des huiles essentielles de la *Ravensara aromatica* Sonnerat de la région de Moramanga, Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département: Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 104p.
- Razafindrakoto, M.M., 1999.** Contribution à l'inventaire des plantes aromatiques et médicinales à valeur économique à l'aide de quelques huiles essentielles de la région de Vakinankaratra, Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département : Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo, 90p.

- Ryuji, S., Haruka, O. et Fumiya, K., 2006.** Two distinct phases of glandular trichome development in hop, *Humulus lupulus* L., *Plant Biotech.* 23:493–496.
- Sarker, B.C., Hara, M. et Uemura, M., 2005.** Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. *Sci. Hort.* 103:387–402.
- Scavron, J., Boaro, C.S.F., Marques, M.O.M et Ferrera, L. C., 2005.** Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L, Lamiaceac, grown with biosolid. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(4):345-352.
- Sharkey, T.D., Yeh, S., 2001.** Isoprene emission from plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:407–436.
- Singh, M. et Ramesh, S., 2000.** Effect of irrigation and nitrogen on herbage, oil yield and water-use efficiency in rosemary grown under semi-arid tropical conditions. *J. Med. Aromat. Plant Sci.* 22(1B):659–662.
- Stubbs, B.J., et Brushett, D., 2001.** Leaf oil of *Cinnamomum camphora*, L., Nees and Eberm. *From Eastern Australia. J. Essent. Oil. Res.* 13:51-54.
- Sturm, A., 1999.** Invertases: Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* 121:1–8
- Tubereso, C.I.G., Barra, A., Angioni, A., Sarritzu, E. et Pirisi, F.M., 2006.** Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle, *Myrtus communis* L., alcoholic extracts and essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 54:1420-1426.
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E.F., Froehlich, J.E. et Croteau, R.L., 1999.** Limonene synthase responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiol.* 120:879-886.
- Weiss,, 1997,** Essential oil group agricultural adviser regalement, Victoria Australia, CAB International., New York, 165-168.
- Zehtab-Salmasi, S., Javanshir, A., Omidbaigi, R., Aly-Ari, H. et Ghassemi-Golezani, K., 2001.** Effects of water supply and sowing date on performance and essential oil production of anise, *Pimpinella anisum* L., *Acta. Agron. Hung.* 49(1):75–81

WEBOGRAPHIE

<http://fr.wikipedia.org>

[http://soignez-vous.com/rubrique/sante/les plantes/? p=928](http://soignez-vous.com/rubrique/sante/les_plantes/?p=928)

<http://www.aroma-zone.com> contacts@aroma-zone.com

<http://www.epicerie/equitable.com/epicerie/catalog/Huiles+essentielles/Huile+essentielle>

<http://www.fondationekopedia.org>

<http://www.huiles-et-sens.com/huile-essentielle-ravintsara>

<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/madagascar/Vol1Issiii.pdf>

<http://www.naturaethik.fr/>

<http://www.nature.helps.com/somara/agora/taxonomy.htm>

<http://www.wingedseed.com/somara/agora/taxonomy.htm>

<http://www.worldagroforestrycentre.org/Sea/Products/AFDbases/AF/asp/SpeciesInfo>

<http://www.aromimport.com/utilisation.html>

<http://www.parapharmanet.com/utilisation.html>

<http://www.rocler.qc.ca/dubreui/chromatographie/CG2.html>

ANNEXE 1 : HYDRODISTILLATION

❖ Matériels

- Hydrodistillateur composé d'un chauffage, cocotte minute transformée, essencier, réfrigérant
- Balance pour peser les matériels végétaux
- Centrifugeuse
- Tubes à centrifuger
- Balance de précision
- Flacons

❖ Mode

- Ajouter un litre d'eau dans la cocotte minute
- Introduire l'échantillon dans la cocotte minute transformée. Prendre la précaution de ne pas plonger l'échantillon dans l'eau
- Mettre la cocotte minute sur le chauffage électrique
- Relier le rodage de la cocotte minute et celui de l'essencier en mettant un peu de mine de crayon pour l'étanchéité et pour faciliter le démontage de l'appareil
- Mettre le robinet de l'essencier en position V pour faire circuler l'eau
- Placer le réfrigérant sur l'essencier
- Ouvrir le robinet du réfrigérant pour faire circuler l'eau
- Emballer l'essencier pour garder la chaleur
- Brancher le réchaud électrique en réglant la température adéquate par le régulateur de la température (mettre au maximum jusqu'à la tombée de la première goutte et diminuer à 3 après)
- A la fin de la distillation (3 heures), prélever l'essence surnageant l'eau dans les tubes à centrifuger en ouvrant le robinet de l'essencier.
- Centrifuger le surnageant dans un centrifugeur pendant 5 minutes à 4000tr/s
- Récupérer l'huile essentielle à l'aide d'une pipette dans un flacon préalablement taré
- Peser l'huile essentielle dans le flacon
- Calcul du rendement

ANNEXE 2 : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Mode opératoire

- Brancher le système électrique
- Ouvrir la vanne du gaz vecteur (N₂) et celle de l'hydrogène alimentant le détecteur
- Mettre l'interrupteur du chromatographe en position de marche pour chauffer l'appareil
- Mettre l'intégrateur
- Fixer les conditions opératoires :
 - **Sur le chromatographe :**
 - ❖ Pression d'entrée : 0,33 bars
 - ❖ Températures : Injecteur : 255°C Détecteur : 255°C
 - ❖ Colonne en programmation de température : T_i = 50°C et T_f = 250°C
 - ❖ Vitesse de programmation : 5°C / min
 - **Sur l'intégrateur :**
 - ❖ Sensibilité du chromatographe : 0,1
 - ❖ Width (largeur du pic à mi-hauteur) : 5 secondes
 - ❖ Spot (bruit de fond) : 2500
 - ❖ Min area (aire minimale intégrée) : 9000
 - ❖ Atténuation : 30
 - ❖ Speed (vitesse de déroulement du papier) : 5 mm/min
- Injecter 1µl de l'échantillon à analyser
- Durée de l'analyse : 40mn
- Appuyer sur START immédiatement après l'injection pour mettre en marche l'intégrateur

ANNEXE 3 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara extraite d'individus jeunes (≤ 15 ans) suivant la phénologie.

Constituants	Phase phénologique de jeunes plantes			
	Débourrement	Croissance de feuilles	Feuillaison	Chute des feuilles
HYDROCARBURES MONOTERPENIQUES				
tricyclène			0,13	
α-pinène	4,53	4,82	4,51	3,54
α -thuyène	0,70	0,53	0,76	0,54
camphène	0,23	0,16	0,20	0,12
β-pinène	3,31	3,31	3,47	2,89
sabinène	14,40	14,47	13,50	13,94
β-myrcène	1,46	1,54	1,50	1,39
α -phelladrène	0,25	0,36	0,46	0,26
α -terpinène	0,72	0,77	0,77	0,66
limonène	0,24	0,66	0,57	0,67
β -phellandrène	0,58	0,78	0,82	0,50
cis- β -ocimène	0,26	0,04	0,03	0,03
γ -terpinène	1,01	1,25	1,27	1,17
trans- β -ocimène	0,12	0,22	0,15	0,16
p-cymène	0,13	0,07	0,11	0,08
cubébène	0,34	0,25	0,35	0,50
terpinolène	0,25	0,31	0,29	0,30
α -compaène	0,17	0,12	0,18	0,05
TOTAL	28,27	28,86	27,99	26,13
PRODUITS OXYGENES				
1,8-cinéole	57,40	58,96	58,74	57,15
linalol	0,04	0,09	0,11	0,07
acétate de linalyle	0,10	0,09	0,08	0,12
terpinène-4-ol	1,91	1,93	1,85	2,29
acétate de térypényl	0,06	0,05	0,06	
α-terpinéol	8,37	7,35	7,84	9,67
acétate de géranyle	0,21	0,15	0,37	0,39
cis-nérolidol	0,04	0,08	0,14	0,24
caryophyllène oxyde	0,08	0,07	0,08	0,09
trans-nérolidol	0,10	0,09	0,16	0,12
TOTAL	68,06	68,72	69,21	69,89
HYDROCARBURES SESQUITERPENIQUES				
β -élémente	0,08	0,09	0,08	0,14
β -caryophyllène	0,50	0,32	0,57	0,46
caryophyllène oxyde	0,16	0,04	0,05	0,08
α -humulène	0,63	0,59	0,66	0,91
lédène	0,07	0,04	0,07	0,05
β -sélénène	0,12	0,21	0,07	0,28
α -muurolène	0,14	0,17	0,25	0,09
β -cadinène	0,31	0,20	0,12	0,19
δ -cadinène	0,04	0,04	0,10	0,06
TOTAL	1,99	1,51	1,65	2,06
COMPOSES NON IDENTIFIES				
1	0,51	0,31	0,20	0,89
2	0,04	0,22	0,13	0,09
3	0,06	0,06	0,04	0,06
4	0,04	0,08	0,05	0,06
5	0,06	0,05	0,05	0,06
6	0,05	0,04	0,09	0,10
7	0,05	0,07	0,03	0,06
8	0,04	0,06	0,14	0,06
9	0,05	0,04	0,03	0,07
10	0,07	0,12	0,06	0,25
11	0,14	0,10	0,16	0,12
12	0,10	0,05	0,11	
13	0,07		0,14	
14	0,58	0,65	0,66	0,84
15	0,04		0,03	0,04
TOTAL	1,45	0,96	1,08	1,74

ANNEXE 4 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara extraite d'individus matures (30 ans) suivant la phénologie.

Constituants	Phase phénologique de la plante			
	Débourrement	Floraison	Fructification	Chute des feuilles
HYDROCARBURES MONOTERPENIQUES				
α-pinène	4,59	4,60	4,12	1,88
α-thuyène	0,69	0,53	0,69	0,31
camphène	0,28	0,17	0,21	0,08
β-pinène	3,31	3,29	4,03	2,21
sabinène	13,80	13,36	12,20	13,36
β-myrcène	1,46	1,52	1,46	1,20
α-phelladrène	0,04	0,15	0,34	0,04
α-terpinène	0,74	0,87	0,70	0,51
limonène	0,03	0,70	0,49	
β-phellandrène	0,74	0,76	0,83	0,61
cis-β-ocimène	0,04	0,06	0,03	0,03
γ-terpinène	1,23	1,44	1,28	1,02
trans-β-ocimène	0,14	0,35	0,15	0,11
p-cymène	0,11	0,08	0,09	0,09
cubébène	0,39	0,24	0,45	0,85
terpinolène	0,30	0,35	0,26	0,27
α-compaène	0,07	0,11	0,35	0,07
TOTAL	27,93	27,96	26,62	22,61
PRODUITS OXYGENES				
1,8-cinéole	55,54	57,53	58,84	57,37
linalool	0,03	0,15	0,14	0,04
acétate de linalyle	0,12	0,10	0,07	0,16
terpinène-4-ol	2,21	2,22	2,04	2,53
acetate de térapényl			0,08	
α-terpinéol	9,08	8,40	8,46	11,17
acétate de géranyle	0,24	0,28	0,40	0,27
cis-nérolidol	0,05	0,07	0,05	0,50
caryophyllène oxyde	0,10	0,08	0,09	0,11
trans-nérolidol	0,10	0,05	0,12	0,04
TOTAL	67,29	68,82	70,03	72,05
HYDROCARBURES SESQUITERPENIQUES				
β-élémentène	0,10	0,10	0,08	0,13
β-caryophyllène	0,46	0,47	0,51	0,53
caryophyllène oxyde	0,04	0,05	0,05	0,13
α-humulène	0,90	0,84	0,72	1,01
lédène	0,10	0,04	0,08	0,04
β-sélinène	0,04	0,06	0,10	0,37
α-murolène	0,08	0,34	0,21	0,06
β-cadinène	0,04	0,22	0,03	0,06
δ-cadinène	0,03	0,04	0,07	0,05
TOTAL	1,79	1,96	1,79	2,36
COMPOSES NON IDENTIFIES				
1	0,98	0,08	0,46	1,23
2	0,06	0,76	0,05	0,07
3	0,07	0,08	0,05	0,06
4	0,03	0,09	0,09	0,06
5	0,06	0,06	0,04	0,08
6	0,06	0,05	0,06	0,15
7	0,05	0,08	0,03	0,04
8	0,03	0,04	0,14	0,03
9	0,04	0,04	0,03	0,08
10	0,05	0,12	0,06	0,25
11	0,22	0,03	0,07	0,21
12	0,03		0,29	
13	0,03			
14	0,72	0,66	0,74	1,08
15	0,03		0,03	0,05
TOTAL	2,43	1,24	1,44	2,58

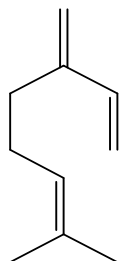
ANNEXE 5 : Variation de la teneur relative (%) des constituants chimiques de l'huile essentielle de ravintsara extraite d'individus vieux (≥ 60 ans) suivant la phénologie.

Constituants	Phase phénologique			
	Débourrement	Floraison	Fructification	Chute des feuilles
HYDROCARBURES MONOTERPENIQUES				
α-pinène	2,89	4,16	4,94	4,37
α -thuyène	0,47	0,66	0,48	0,71
camphène	0,11	0,15	0,16	0,15
β-pinène	2,58	3,20	3,31	3,19
sabinène	11,67	12,44	13,67	14,07
β-myrcène	1,26	1,60	1,56	1,42
α -phelladrène		0,39	0,02	
α-terpinène	0,62	1,09	0,91	0,79
limonène			0,61	
β -phellandrène	0,62	0,65	0,78	0,64
cis- β -ocimène	0,03	0,05	0,03	
γ-terpinène	1,13	1,75	1,43	1,29
trans- β -ocimène	0,11	0,34	0,17	0,09
p-cymène	0,11	0,06	0,07	0,10
cubébène	0,66	0,14	0,04	0,35
terpinolène	0,29	0,43	0,35	0,31
α -compaène	0,06	0,04	0,21	0,04
TOTAL	22,62	27,16	28,76	27,52
PRODUITS OXYGENES				
1,8-cinéole	56,60	57,65	58,12	58,52
linalool	0,14	0,07	0,10	0,03
acétate de linalyle	0,16	0,10	0,10	0,11
terpinène-4-ol	2,55	2,67	2,09	2,13
acetate de térapényl			0,32	
α-terpinéol	12,63	8,33	7,66	8,42
acétate de géranyle	0,65	0,63	0,63	
cis-nérolidol	0,04		0,04	0,04
caryophyllène oxyde	0,11	0,07	0,07	0,08
trans-nérolidol	0,05	0,04	0,17	0,03
TOTAL	72,93	69,56	69,29	69,36
HYDROCARBURES SESQUITERPENIQUES				
β -élémente	0,13	0,11	0,12	0,08
β -caryophyllène	0,49	0,58	0,42	0,33
caryophyllène oxyde	0,13	0,07	0,05	0,03
α -humulène	0,97	1,06	0,75	0,58
lédène	0,04			
β -sélénène	0,66	0,04	0,17	0,32
α -muurolène	0,05	0,07	0,05	0,04
β -cadinène	0,34	0,39	0,47	0,39
δ -cadinène	0,05	0,27	0,07	0,04
γ -muurolène	0,03			
TOTAL	2,89	2,59	2,10	1,83
NON IDENTIFIES				
1	0,10	0,03	0,04	
2	0,06	0,08	0,05	0,05
3	0,08	0,14	0,04	0,09
4	0,08	0,05	0,04	0,04
5	0,08	0,03	0,06	0,05
6	0,05	0,03	0,05	0,03
7	0,07			0,08
8	0,25			0,04
9	0,04			
10		0,06	0,20	0,12
11		0,04	0,04	
12	0,98	0,92	0,62	0,70
TOTAL	1,79	1,38	1,13	1,20

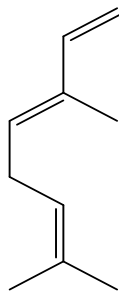
ANNEXE 6: STRUCTURE DES CONSTITUANTS CHIMIQUES

1-MONOTERPENES

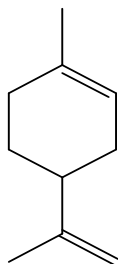
β - Myrcène



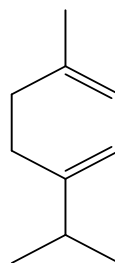
Trans- β -Ocimène



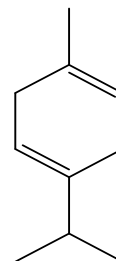
Limonène



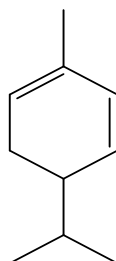
α - Terpinène



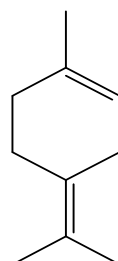
γ -Terpinène



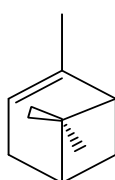
α - Phyllandrène



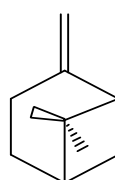
Terpinolène



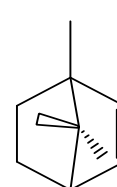
α -Pinène



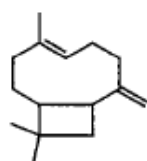
β -Pinène



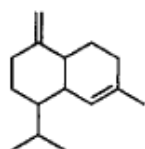
Camphène



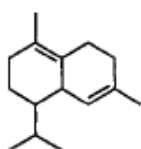
2-SESQUITERPENES



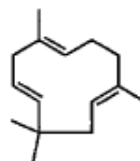
β -Caryophyllene



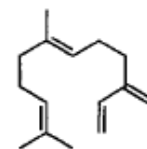
γ -Cadinene



δ -Cadinene

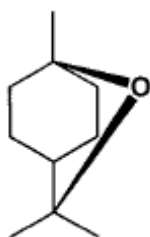


α -Humulene



E- β -Farnesene

3-MONOTERPENES OXYGENES



1,8-Cineole

Titre : INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA FEUILLE ET DE LA PLANTE SUR LE RENDEMENT ET LA QUALITE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE RAVINTSARA (*Cinnamomum camphora* L.)

Auteur : RASENDRAMIADANA Faramalala

RESUME

Les variations du rendement et de la composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara ont été suivies en fonction de l'âge chronologique de la plante, de l'âge ontogénique de la feuille et du cycle phénologique.

Le rendement diminue avec l'âge de la plante, variant de 1,73 à 0,94% pour des individus de 5 et 60ans, respectivement. Il est généralement élevé (1,43%) pour les feuilles complètement matures mais plus faible pour les feuilles en expansion (1,04%) et sénescentes (1,21%). Les feuilles récoltées durant la saison humide accumulent plus d'huile essentielle (1,16%) que celles collectées au cours la saison sèche (0,81%). Au cours de la floraison, de la chute et du débourrement des feuilles, le rendement reste relativement faible (0,92%) puis devient importante (1,21%) lors de la fructification.

La composition chimique de l'huile essentielle de ravintsara est affectée par l'âge de la feuille et de la plante. Les huiles provenant de jeunes individus sont riches en monoterpènes (29,12%), par rapport aux huiles extraites à partir d'individus âgés (26,50%). Les teneurs en produits oxygénés et en sesquiterpènes varient peu avec l'âge de la plante. L'analyse de la composition des échantillons commerciaux entre 2005 et 2007 indique que l'huile essentielle de ravintsara vendue sur le marché provient principalement d'individus jeunes.

Les feuilles matures apparaissent comme étant les plus riches en monoterpènes (29,64%) alors que les feuilles sénescentes présentent une teneur plus faible (26,35%). Par ailleurs, La teneur en produits oxygénés, particulièrement en 1,8-cinéole, est maximale (59,36%) au niveau des feuilles matures et minimale (54,97%) dans les feuilles jeunes. L'huile extraite à partir de feuilles sénescentes se distingue par une forte teneur en sabinène (15,67%).

Les feuilles récoltées au cours de la saison des pluies d'Octobre à Février donnent une huile essentielle riche en monoterpènes (~31%) et en produits oxygénés (~60 %).

Mots clés : camphrier, 1,8-cinéole, métabolites secondaires, phénologie, α -pinène, β -pinène, terpinène-4-ol, α -terpineol, sénescence

Encadreur : Dr Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA

Title: RAVINTSARA (*Cinnamomum camphora*) ESSENTIAL OIL YIELD AND COMPOSITION AS INFLUENCED BY LEAF DEVELOPMENTAL STAGES AND PLANT AGE

Author: RASENDRAMIADANA Faramalala

SUMMARY

The variation of essential oil yield and composition of ravintsara were monitored according to the chronological age of the plant, leaf developmental stages and the phenology.

Oil yield decreased significantly from 1.73 to 0.94% from 5 to 60 year-old individuals, respectively. Oil content increased from young (1.04%) to fully mature (1.43%) leaves then decreased to 1.21% within senescent leaves. The percentage of oil obtained from leaves is higher (1.16%) during the rainy season but lower (0.81%) during dry season. Oil yield was lower (0.92%) during the fall, flushing and flowering but gradually increased during the fruiting time (1.21%).

Young individuals displayed higher amounts of monoterpenes (29.12%) than old ones (26.50%). However, oxygenated compounds and sesquiterpenes were not significantly affected by plant age. Chemical analysis of marketed oils from 2005 to 2007 indicated that their profiles were closer to those from young individuals.

The optimum amount of monoterpenes (29.64%) were recorded when leaves are fully expanded and the minimum (26.35%) on senescent leaves. Mature leaves had higher content (59.36%) of 1,8-cineole than young leaves (54.97%). However, senescent leaves were characterized by higher content in sabinene (15.67%).

Leaves harvested during the rainy season were particularly enriched with monoterpenes (~31%) and oxygenated terpenoids (~60 %).

Keywords: aging, camphor-tree, 1,8-cineole, phenology, α -pinene, β -pinene, secondary metabolites, terpinene-4-ol, α -terpineol

Supervisor: Dr Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA