Thèse

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'université de Guyane

Discipline : *Sciences agronomiques et écologiques*

Spécialité : *Biologie des organismes, biologies animales, végétales et microbiennes.*

Présentée et soutenue publiquement le *4 février 2020* par :

CLARA ZAREMSKI

Pour une production contrôlée d'agarwood *d'Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte en Guyane : Approches métagénomique, biochimique et histologique.

JURY

Nadine Amusant	Chercheure	Co-encadrante de Thèse
Amadou Bâ	PU, HDR	Président du Jury, Rapporteur
Jacques Beauchêne	Chercheur	Examinateur
Marc Ducousso	DR, HDR	Directeur de Thèse
Marie Fleury	MCF	Examinatrice
Christine Gérardin	PU, HDR	Rapporteur
Franck Roubaud	MCF	Membre invité

Ecole Doctorale n°587 : *Diversités, Santé et développement en Amazonie*

« Tout ce qui arrive est le résultat d'une confluence. »

Dr. Norin Chai

« Les idées provocatrices sont légitimes, au moins pour s'assurer que ce n'est pas par habitude mentale qu'on exclut certaines possibilités. »

Pr. Thibault Damour

« Alba embarqua pour Tahiti le 13 Novembre 1851. »

D'après Elizabeth Gilbert, The Signature of All Things.

RAPPEL DU TITRE

Pour une production contrôlée d'agarwood d'Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte en Guyane : Approches métagénomique, biochimique et histologique.

RESUME

Aquilaria Lam. est un genre d'arbre tropical de la famille des Thymelaeaceae, originaire de l'Asie du Sud-Est. Ce genre compte actuellement vingt et une espèces dont le bois sain est de couleur blanche. Lorsque l'arbre est blessé, en interaction avec des micro-organismes environnementaux, l'arbre produit un bois transformé par sa forte teneur en composés secondaires. Ce bois transformé, appelé agarwood, présente une forte teneur en oléorésines, composées notamment de chromones et de sesquiterpènes, qui lui confèrent sa couleur noire.

L'agarwood est particulièrement apprécié pour son odeur intense et boisée. Il est utilisé en tant qu'encens dans certaines cérémonies religieuses, ou pour la fabrication de bijoux ou d'objets aux connotations religieuses. L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation d'agarwood ou de bois blanc est également très prisée en parfumerie et dans certaines médecines traditionnelles, notamment chinoise, tibétaine et ayurvédique, pour ses propriétés sédatives et anticancéreuses, notamment. Les feuilles sont, également, consommées en infusions, auxquelles sont attribuées beaucoup de bienfaits. Les produits issus d'*Aquilaria* sont très demandés sur le marché, notamment en Asie du Sud-Est et au Moyen-Orient. Aussi, la valeur commerciale des produits issus des arbres du genre *Aquilaria* est élevée, avec un marché mondial estimé en 2018, à 11 milliards d'US$.

La stimulation de la production d'oléorésine par des méthodes inadaptées est un des problèmes, parmi d'autres, que rencontre le marché de l'agarwood. A cela s'ajoutent d'autres problèmes tels que le contrôle de la génétique de la plante, la maîtrise de la conduite des plantations, l'initiation de la production d'agarwood et sa maturation en interaction avec des micro-organismes sélectionnés, qui devraient permettre d'obtenir un agarwood de qualité contrôlée, et les méthodes d'extraction des huiles essentielles.

Face à la demande croissante sur le marché mondial, les agriculteurs guyanais originaires du Laos, désireux de diversifier leurs activités, ont participé à des plantations expérimentales d'*Aquilaria* en Guyane. L'objectif du projet Aquil@Guyane est d'aider

ces planteurs à produire une huile essentielle de composition chimique contrôlée, unique sur le marché mondial, par sa composition et son mode de production, respectueuse de la biologie de l'arbre et de l'environnement.

Face à ces enjeux, le travail de thèse a consisté à mener des recherches pour développer la production d'agarwood sur *Aquilaria crassna* en Guyane. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les communautés fongiques présentes dans le bois d'*A. crassna*. Ensuite, nous avons évalué la composition des huiles essentielles obtenues après inoculations de ces arbres par des champignons de Guyane. Enfin, nous avons testé la capacité de cellules de cals d'*A. crassna* à produire de l'agarwood après inoculation de champignons, en laboratoire.

Le but était d'identifier des champignons couramment retrouvés dans l'agarwood mais aussi des champignons propres aux champs de Guyane qui pourraient induire une composition singulière de l'agarwood de Guyane. Cette étude a permis de constater que peu de Basidiomycètes sont présents dans le bois blanc d'*Aquilaria* alors qu'ils sont couramment présents dans l'agarwood. Sur les champs d'*A. crassna* en Guyane, les champignons en interaction avec les *A. crassna* ont été caractérisés avant et après blessure des arbres. Ainsi, les variations de cortèges de micro-organismes entre les parcelles et entre les arbres sains et blessés ont été mises en évidence. Dans le village de Cacao, deux genres de champignons principaux sont associés aux arbres sains, il s'agit d'*Aspergillus* et de *Nigrospora*. Dans le village de Régina, les genres de champignons associés aux arbres sains sont *Cladosporium* et *Periconia*. Ce dernier genre, *Periconia*, est également le genre majoritaire dans les arbres blessés de Régina. A Cacao, les arbres blessés sont en interaction avec deux souches principales, pour les parcelles A et B, respectivement *Paraphaeosphaeria* et *Cladosporium,* alors que les arbres de la parcelle C sont en interaction avec plusieurs genres dont aucun n'est majoritaire. Ces champignons endophytes sont donc caractéristiques des plantations de Guyane. Grâce à la détermination des souches de champignons présents dans les *Aquilaria* sains, en comparaison avec des agarwood témoins, nous avons mis en évidence que les Basidiomycètes sont très présents dans les témoins d'agarwood alors qu'ils ne le sont presque pas, au profit des Ascomycètes, dans le bois sain.

Deux méthodes d'induction de l'agarwood ont été comparées : une méthode d'induction par blessure avec ou sans ajout de terre de la plantation et une méthode d'induction par inoculation de souches sélectionnées de Basidiomycètes. Des champignons ont été sélectionnés pour leur origine Guyanaise, leur caractère lignivore (pourritures fibreuse et cubique), la relative facilité à les cultiver au laboratoire. Ces deux modes d'inoculation ont permis la production d'agarwood. La méthode d'induction de l'agarwood par inoculation de champignons lignivores de Guyane, notamment les champignons de pourriture fibreuse *Ganoderma resinaceum*, *Gloeophyllum trabeum* et *Pycnoporus sanguineus,* est la plus performante pour obtenir un agarwood de qualité proche du témoin d'agarwood du Laos.

La Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) a été utilisée pour différencier le bois blanc et l'agarwood, mais aussi pour distinguer différentes compositions chimiques d'agarwood. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de l'analyse biochimique ; l'utilisation de la SPIR pour contrôler la qualité de l'agarwood avant son hydrodistillation est envisageable. Ce contrôle permettrait d'hydrodistiller des lots d'agarwood de qualité homogène et ainsi d'obtenir des huiles essentielles de qualité homogène.

Une méthode de culture de cals d'*Aquilaria* a été mise au point. Les cals ont ensuite été inoculés avec des souches de champignons sélectionnées. Les résultats indiquent que la production de terpènes par les cals d'*Aquilaria* contaminés par des souches de champignons de pourriture fibreuse est possible en laboratoire. Cela permet d'envisager la mise en place de recherches en vue de développer de l'agarwood en laboratoire, à partir de cals, et d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de défense des cellules d'*Aquilaria* face à l'agression fongique.

Le modèle développé en Guyane pour la production d'huiles essentielles à partir d'agarwood d'*Aquilaria* repose sur la mise en place de plantations pour lesquelles on induit la production d'agarwood par diverses méthodes. Les recherches pourraient se prolonger en étudiant la production d'agarwood à partir des champignons les plus performants identifiés durant le travail de thèse et par la sélection de nouvelles souches guyanaises pour la production d'agarwood. Enfin, ce travail devra déboucher sur un transfert de compétences techniques vers les agriculteurs, tout en maintenant les collaborations entre scientifiques et agriculteurs dans l'objectif d'une pratique toujours au fait des nouveautés scientifiques, du respect de l'environnement et des cadres législatifs nationaux et internationaux.

MOTS CLES

Agarwood*, Aquilaria*, cals, champignons, composition chimique, développement, Guyane, histologie, huile essentielle, hydrodistillation, inoculation contrôlée, microorganismes, Séquençage Nouvelle Génération (NGS), Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR), Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTO)

ABSTRACT

Aquilaria Lam. is a genus of tropical tree of the family Thymelaeaceae, native to Southeast Asia. This genus currently has 21 species whose healthy wood is white. When the tree is injured, in interactions with environmental micro-organisms, the tree produces a wood transformed by its high content of secondary compounds. This processed wood, called agarwood, has a high content of oleoresins, including chromones and sesquiterpenes, which gives it its black color.

Agarwood is particularly appreciated for its intense and woody smell. It is used as incense in certain religious ceremonies, or for the manufacture of jewellery or objects with religious connotations. The essential oil obtained by hydrodistillation of agarwood or white wood is also very popular in perfumery and in some traditional medicines, especially Chinese, Tibetan and Ayurvedic, for its sedative and anticancer properties, among others. The leaves are also consumed in infusions, which are attributed many benefits. Products from *Aquilaria* are in great demand in the market, particularly in South East Asia and the Middle East. Also, the commercial value of *Aquilaria* tree products is high, with a world market estimated in 2018, at US $ 11 billion.

Stimulating the production of oleoresin by unsuitable methods is one of the problems among others in the agarwood market. Added to this are other problems such as the control of the genetics of the plant, the control of the management of plantations, the initiation of the production of agarwood and its maturation in interaction with selected microorganisms which must allow to control agarwood quality and methods of extracting essential oils. Facing the growing demand of the world market, translated by Guyanese farmers from Laos, wishing to diversify their activities, experimental plantations of *Aquilaria* have been set up in French Guiana. The objective of the Aquil @ Guyane project is to help these planters produce an essential oil of controlled chemical composition, unique in the world market by its composition and production method, respectful of the biology of the tree and the environment.

In this frame, the thesis work consisted of conducting research to develop agarwood production with *A. crassna* in French Guiana. At first, we characterized the fungal communities present in the *A. crassna* wood. Then, we evaluated the composition of the essential oils obtained after inoculation of these trees by fungi of Guyana. Then we tested the cell capacity of *A. crassna* callus to produce agarwood after inoculation with fungus, in laboratory conditions.

The goal was to identify fungi commonly found in agarwood but also the fungi specific to the fields of Guyana that could induce a unique composition of this Agarwood. This study found that few Basidiomycetes are present in *Aquilaria* whitewood while they are commonly found in agarwood. On the fields in French Guiana, fungi interacting with *A. crassna*, were characterized before and after injury of the trees. Thus, the variations of processions of micro-organisms between plots and between healthy and injured trees were highlighted. Thus, in the village of Cacao, two main genera of fungi interact with healthy trees, namely *Aspergillus* and *Nigrospora*. In the village of Regina, the fungal genera associated with healthy trees are *Cladosporium* and *Periconia*. The latter genus, *Periconia*, is also the majority genus in the injured trees of Regina. In Cacao, the injured trees interact with two main strains for parcels A and B, respectively *Paraphaeosphaeria* and *Cladosporium*, while the trees in plot C interact with several genera, none of which are dominant. Thanks to the determination of fungal strains present in healthy *Aquilaria*, in comparison with control agarwoods, we have shown that Basidiomycetes are very present in agarwood controls when they are almost not, for the benefit of Ascomycetes, in the healthy wood.

Two methods of agarwood induction were compared: a wound induction method with or without addition of soil of the plantation and a method of induction by inoculation of selected strains of Basidiomycete. Fungi were selected for their Guyanese origin, their lignivorous character (fibrous and cubic rots), the relative ease of cultivating them in the laboratory. These two modes of inoculation allowed the production of agarwood. The method of induction of agarwood by inoculation of guinea-fungus fungi, especially the fibrous rot fungi *Ganoderma resinaceum*, *Gloeophyllum trabeum* and *Pycnoporus sanguineus*, is the most effective for obtaining a quality agarwood close to the internal control.

Near Infrared Spectrometry (NIRS) has been used to differentiate between whitewood and agarwood, but also to distinguish between different agarwood chemical compositions. The results obtained are consistent with those of the biochemical analysis; the use of NIRS to control the quality of agarwood before hydrodistillation is feasible. This control would enable to hydrodistillate batches of agarwood homogeneous quality and thus obtain essential oils of consistent quality.

A culture method of *Aquilaria* callus has been developed. The calli were then inoculated with selected fungal strains. The results indicate that the production of terpenes by *Aquilaria* calli contaminated with fibrous rot fungi strains is possible in the laboratory. This allows considering the establishment of researches to develop agarwood in laboratory, from callus and to improve our knowledge on the defence mechanisms of the cells of *Aquilaria* against the fungal aggression.

The model developed in Guyana for the production of essential oils from *Aquilaria* agarwood is based on the establishment of plantations whose production of agarwood is induced by various methods. The research could be extended by studying the production of agarwood from the best performing mushrooms identified during the thesis work and by the selection of new Guyanese strains for the production of agarwood. Finally, this work will lead to a transfer of technical skills to farmers, while maintaining collaborations between scientists and farmers in the goal of a practice always aware of new science, respect for the environment and national and international legislative context.

KEY WORDS

Agarwood, *Aquilaria*, callus, chemical composition, essential oil, French Guiana, fungi, histology, hydrodistillation, improvement, microorganisms, monitored inoculation, Near Infrared Spectrometry (NIRS), Next-Generation Sequencing (NGS), Operational Taxonomical Units (OTU)

REMERCIEMENTS

Cette thèse a pu être réalisée grâce à la Collectivité Territoriale de Guyane, dans le cadre du Projet Aquil@Guyane: *« Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'« Aquilaria (Agarwood) » haut de gamme, et de produits dérivés, en Guyane »,* co-financé par l'Europe, la Collectivité Territoriale de Guyane et le CIRAD, Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

Avant toute chose je tiens à remercier les membres du jury, Madame Christine Gérardin et Monsieur Amadou Bâ pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que Madame Marie Fleury et Monsieur Jacques Beauchêne d'en être les examinateurs. Je suis aussi sensible à l'honneur que me font Monsieur Franck Roubaud, Madame Nadine Amusant et Monsieur Marc Ducousso d'être membres de ce jury de thèse.

Je remercie le comité directeur de l'Ecole Doctorale de Guyane, l'Ecole Doctorale n°587 « Diversités, Santé et Développement en Amazonie » d'avoir validé mon sujet de thèse. Et je remercie tout particulièrement le président actuel de l'Ecole Doctorale, Monsieur Jean-Charles Robinson, son prédécesseur, Monsieur Abdennebi Omrane et Madame Rachelle Ho Coui-Youn, responsable administrative et de gestion, pour leur disponibilité et leur efficacité. Je remercie Monsieur Antoine Primerose, Président de l'Université de Guyane.

Je remercie Monsieur Patrice This et Monsieur Norbert Billotte qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires. Ce travail a été effectué au CIRAD, au sein de l'unité mixte de recherche (CIRAD/INRA, Montpellier SupAgro) : AGAP *« Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales »* dirigée par Monsieur Patrice This. Mes activités de recherche ont été principalement réalisées dans le laboratoire de phytopathologie de l'équipe GS « *Génome et Sélection* » dirigée par Monsieur Norbert Billotte.

Je remercie Monsieur Jacques Beauchêne, Directeur et Représentant du Cirad en Guyane, qui m'a soutenue et accueillie avec bienveillance au Laboratoire des Sciences

du Bois à Kourou, ainsi que Monsieur Soepe Koese qui m'a aidée pour la découpe minutieuse des échantillons de bois.

Je remercie Monsieur Marc Ducousso, qui me fait l'honneur d'être le directeur de cette thèse. Il a accepté de suivre et diriger ce travail. Sa disponibilité, son souci du travail bien fait, sa rigueur scientifique, ses suggestions m'ont été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très haute considération.

Je remercie Madame Nadine Amusant, qui me fait l'honneur d'être la co-encadrante de cette thèse. Même si l'Océan Atlantique nous séparait souvent, je la remercie pour l'appui qu'elle m'a toujours assuré et pour la confiance accordée depuis les tâtonnements des premiers instants jusqu'aux dernières mises au point. Ses grandes compétences dans le domaine de la phytochimie, son soutien moral, son profond humanisme et sa simplicité m'ont été très bénéfiques.

Je remercie vivement Monsieur Philippe Lacombe, Ex-Recteur de Guyane et Monsieur Richard Laganier, Ex-Président de l'Université de Guyane, pour leurs soutiens, leurs compétences et leurs conseils pratiques qui ont su recentrer mes réflexions vers l'essentiel, surtout au démarrage de ma thèse.

Je remercie Monsieur Franck Roubaud, Directeur et Madame Karine Rinna, Responsable Ressources, de Guyane Développement Innovation, ainsi que Monsieur Philippe Poggi, Délégué Régional à la Recherche et à Technologie de Guyane, pour leurs conseils sur l'innovation et la recherche et leurs encouragements lors de la fête de la Science en 2017, à Cayenne.

Je remercie Madame Marie-Laure Navas, directrice du CEFE, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive de Montpellier, pour ces précieux conseils et son regard extérieur, qui m'ont permis de ne pas oublier la transversalité de la science. Il m'a été permis de la rencontrer grâce au programme de mentorat « Femmes et Science » de Montpellier.

Je remercie les agriculteurs de Guyane : Madame Sue Ya, Messieurs Hu Ya, Didier Tcha, et Pierre Tcha, qui ont toujours été disponibles notamment pour la coupe et l'inoculation des arbres dans leurs parcelles d'*Aquilaria*.

Je remercie Messieurs Georges Michaloud et Claude Andary, chercheurs et experts de l'arbre *Aquilaria,* pour l'appui qu'ils m'ont toujours apporté, notamment dans les

parcelles expérimentales de Cacao et de Régina en Guyane et dans l'élaboration de ma synthèse bibliographique.

Je remercie Madame Chantal Menut, Professeure Emérite de la Faculté de Pharmacie de Montpellier, pour m'avoir accompagnée dans mon travail sur la biochimie de l'agarwood.

Je remercie Monsieur Jean-Luc Ansel, Directeur et Fondateur de la Cosmetic Valley pour la vision industrielle qu'il m'a apportée, notamment en matière de Cosmétologie et de Parfumerie.

Je remercie Madame Sovanmoly Hul pour sa disponibilité et surtout pour sa grande connaissance des herbiers d'*Aquilaria* au Muséum National d'Histoire Naturel à Paris.

Toute ma sympathie à Madame Chistine Sagnier et à Messieurs Cédric Malandain et Olivier Sibourg qui ont aussi contribué à la réalisation de ce travail. Leurs conseils scientifiques et leur gentillesse m'ont été d'un grand soutien.

J'exprime toute ma reconnaissance à Benjamin Heuclin pour l'efficacité de ses conseils et de son appui technique, particulièrement en bio-informatique et bio-statistique.

Je remercie le service formation de l'UMR AGAP, en particulier Mesdames Dominique This et Hélène Joly, pour m'avoir accueillie avec bienveillance au début de ma thèse et de m'avoir mise en contact avec les autres doctorants de l'UMR. S'en est suivi une belle aventure par la reprise de l'association des doctorants et non permanents d'Agap, « Graines d'AGAP » et la création du congrès les « Agapiades ». Merci à Benjamin, Marion, Lisa, Lauriane, Aurélie, Thibault, Antoine, Léo, Aurélien, Clément, Kelly et Ian.

Sincères remerciements à Roselyne, Bryan, Agathe, Yohan, Julien, Antoine, Frédéric, Thierry, Arnaud, Yannick, Julien, Deborah, Amandine, Maurane, pour leur bonne humeur et leur grande disponibilité.

Que tous ceux qui m'ont apporté leur soutien, sous une forme ou sous une autre, trouvent ici mes chaleureux remerciements.

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Articles publiés

Zaremski C, Ducousso-Détrez A, Amusant N *et al.* (2019) Taxonomic study of French Guiana fungi to identify and isolate pure cultured fungi for oleoresin production in *Aquilaria*: use of sequences from the small ribosomal DNA (r) subunit (SSU) and the two primer pairs SR6/SR10R and SR7/SR1R. *PRO Ligno* 15(3): 3-15. http://www.proligno.ro/en/articles/2019/3/ZAREMSKI.pdf

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, *et al.* (2018) NGS identification of fungi potentially implicated in the production of agarwood from *Aquilaria* spp. Trees. *PRO Ligno* 14(3): 9-18. http://www.proligno.ro/en/articles/2018/3/ZREMSKI.pdf

Prix et récompenses

Ron Cockcroft Award (RCA) of International Research Group on Wood Protection, IRG WP 52, Numazu City, Japan, 9-13 May 2021.
Zaremski C., Ducousso M., Andary C., *et al.* (2020) Chemical composition of agarwood of *Aquilaria crassna* Pierre ex. Lecomte induced by Basidiomycetes from French Guiana.

Article soumis

Zaremski C, Andary C, Amusant N, Michaloud G, Ducousso M (2019) Review: A review of the conditions of worldwide agarwood production and development prospects in French Guiana. *Biodiversity and Conservation*, 36p [Submitted]

Congrès scientifiques

Zaremski C**,** Ducousso-Détrez A**,** Amusant N**,** *et al.* (2019) Biodiversity of wood-decaying fungi in French Guiana sequences of the small subunit (SSU) of ribosomal (r) DNA and tehe two primer parirs SR6/SR10R and SR7/SR1R. *International Research Group on Wood Protection*, IRG 50, Quebec, Canada, 12 Mai 2019/16 Mai 2019. 18 p. http://agritrop.cirad.fr/593318/

Zaremski C (2019) Détermination des microorganismes fongiques présents dans les arbres du genre *Aquilaria* dans les plantations de Cacao et Régina, en Guyane. *Les Agapiades*, Cirad, Montpellier.

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, *et al.* (2018) Characterization of fungal communities associated with *Aquilaria* spp. for the production of agarwood. *12th*

Congress of the International Plant Molecular Biology, Montpellier, France, August 5-10, 2018. [Poster] http://agritrop.cirad.fr/591143/

Zaremski C (2018) Caractérisation moléculaire des communautés fongiques associées au genre d'arbre *Aquilaria* dans la production d'Agarwood, en Asie du Sud Est et en Guyane. *Les Agapiades*, Cirad, Montpellier.

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, *et al.* (2017) NGS analysis of fungal OTUs in *Aquilaria* sp. from French Guyana, Cambodia, Laos and Thailand. *In : 48th IRG Annual Meeting Proceedings*, Genth, Belgium, 4-8 June 2017. IRG. s.5: s.n. 18 p. http://agritrop.cirad.fr/585227/

Zaremski C, Amusant N, Ducousso M (2017) Caractérisation des communautés fongiques associées à la production d'agarwood par *Aquilaria* spp. *In : Le Printemps de Baillarguet 9ème édition, Actes de conférences,* Campus de Baillarguet, France, 23-24 May 2017. PDB. s.1.

Communications

Salon International de la Cosmetic 360 (2019) Promotion du projet AQUIL@GUYANE au travers d'un flyer « *Aquilaria* value chain in french guiana: Scientific and technical support for the creation and development of an eco-responsible » sur le stand porté par la Collectivité Territoriale de Guyane, organisé par la Cosmetic Valley, Paris, du 15 au 16 octobre 2019

Ma thèse en 180 Secondes (2018) - Classement au concours finale régionale de Guyane : 3ème. - https://www.youtube.com/watch?v=8m86TKwCe0A

Fête de la Science à l'Université de Guyane (2017)

Participation au village des sciences (7 octobre 2017) et à des cycles de conférence sur le sujet : "*Aquilaria*, de la plante au parfum" : tenue du stand : « De la Plante au Parfum », 7 octobre 2017, Université de Guyane ; https://www.fetedelascience.fr/pid35201/fiche-evenement.html?identifiant=33533880

Afterwork : « C'est quoi cette science » (10 octobre 2017), Guyane Développement Innovation.

Zaremski C, Ducousso M (2017) Pourquoi le bois d'agar est-il si précieux ? (2017) *The Conversation France*, Paris, 8 p.https://theconversation.com/pourquoi-le-bois-dagar-est-il-si-precieux-85007

AVANT-PROPOS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du Projet FEDER Aquil@Guyane: *« Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'« Aquilaria (Agarwood) » haut de gamme, et de produits dérivés, en Guyane* », projet cofinancé par l'Europe, la collectivité territoriale de Guyane et par le CIRAD.

L'objectif du projet est de produire en Guyane des oléorésines de composition contrôlée à partir de conditions de culture les plus biologiques possibles et de contaminations fongiques orientées du bois d'*Aquilaria.* Cet arbre a la particularité, lorsqu'il est agressé, de développer du bois noirci, l'agarwood, dont est extraite une oléorésine très prisée par l'industrie cosmétique. Cette résine, produite en Guyane a vocation à concurrencer l'oléorésine produite à partir d'injections chimiques dans les plantations d'*Aquilaria* en Asie du Sud-Est. En effet, la méthode des injections chimiques est contestée par les parfumeurs occidentaux et les acheteurs des Émirats arabes unis qui sont les principaux acheteurs au niveau international.

L'objet de cette thèse est de déterminer diverses souches de champignons, issues du milieu naturel Guyanais, qui induiront la production d'agarwood de composition contrôlée, en Guyane. Pour ce faire, diverses méthodologies sont mises en place afin de répondre aux principales questions de recherches, notamment : existe-t-il, en Guyane des cortèges de champignons spécifiques qui pourront permettre de produire du bois noirci de haute qualité, en interaction avec des arbres du genre *Aquilaria* ? Quels enseignements tirer de la caractérisation des cortèges de champignons, en particulier en ce qui concerne les relations plantes-microorganismes ?

Dans ce travail de thèse, après un travail bibliographique visant à déterminer en quoi le développement des plantations d'*Aquilaria* en Guyane peut améliorer la production d'huiles essentielles d'agarwood, quatre méthodologies sont développées pour caractériser les principaux champignons impliqués dans la production d'oléorésine, d'agarwood et d'huiles essentielles haut de gamme chez *Aquilaria* en Guyane : les analyses par Spectroscopie Proche Infrarouge (SPIR), les analyses en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) et

en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), les analyses d'ADN par séquençage haut débit, et les analyses en histologie en relation avec les mécanismes de défense de la plante.

TABLE DES MATIERES

Rappel du titre iii
Résumé v
Abstract ix
Remerciements xiii
Contributions scientifiques xvii
Avant-Propos xix
Table des matières xxi
Liste des Tableaux xxv
Liste des Figures xxvi

Introduction générale 1
Chapitre bibliographique 13
Introduction du Chapitre bibliographique 13
A review of the conditions of worldwide agarwood production and development prospects in French Guiana 15
ABSTRACT 16
RESUME 17
INTRODUCTION 18
AQUILARIA, DESCRIPTION OF A VULNERABLE GENUS 20
AGARWOOD, A WOOD CONSIDERED AS ONE OF THE MORE PRECIOUS IN THE WORLD 26
HOW TRADING AGARWOOD GOES TO ENDANGER *AQUILARIA* TREES 30
QUALITY OF AGARWOOD AND PERSPECTIVES OF IMPROVEMENT 34
PROSPECTS FOR DEVELOPMENT OF AGARWOOD PRODUCTION: PLANTING *AQUILARIA* IN FRENCH GUIANA 39
CONCLUSION 42
REFERENCES 44

Chapitre 1 : Quelles sont les communautés fongiques associées aux *Aquilaria crassna* de Guyane ? 51
Introduction du Chapitre 1 51
Caractérisation des communautés fongiques associées à *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte en plantation en Guyane française. 53
RESUME 54
INTRODUCTION 55
MATERIEL ET METHODE 58
Sites de l'étude 58
Dispositif de terrain 59
Descriptif des échantillons 59
Extraction et quantification de l'ADN 60
Amplification par PCR 60
Electrophorèse en gel d'agarose 61
Analyse en F-RISA 62
Séquençage Illumina 62
RESULTATS 64
Résultats généraux de séquençage 64
Résultats généraux après assignation taxonomique 65
Diversité des champignons en fonction des parcelles et de l'état sanitaire du bois 67
DISCUSSION 75
CONCLUSION 78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 79
TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES 82
FIGURES SUPPLEMENTAIRES 87

Chapitre 2 : Peut-on orienter la composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* en fonction du mode d'induction ? 91
Introduction du Chapitre 2 91
Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction. 93
RESUME 94
INTRODUCTION 96
MATERIEL ET METHODE 99
Site de l'étude 99
Matériel biologique : sélection des champignons utilisés 99
Matériel végétal : la sélection des arbres de l'étude 103

Inoculation ciblée de souches de champignons dans les arbres en champs 104
Inoculations de champignons environnementaux par application de sol ou non sur une blessure de surface sur les arbres en champs 107
Observations visuelles 108
Conditions expérimentales de l'hydrodistillation des différents échantillons 109
Conditions expérimentales d'analyses par GC-MS 110
RÉSULTATS 111
Observation des surfaces de propagation du bois noirci 111
Les composés caractéristiques des échantillons expérimentaux obtenus par hydrodistillation 114
DISCUSSION 126
CONCLUSION 131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 132
TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES 134
FIGURES SUPPLEMENTAIRES 138
Détection rapide de l'agarwood et évaluation de sa composition chimique par spectrométrie proche infrarouge (SPIR) 143
RESUME 144
INTRODUCTION 145
MATERIEL & METHODE 148
Site de l'étude et matériel biologique 148
Préparation du matériel pour les mesures en SPIR 148
Traitement bio-informatique 149
RESULTATS 150
DISCUSSION 152
CONCLUSION 154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 155
Chapitre 3 : Peut-on envisager de produire de l'agarwood en laboratoire à partir de cals d'*Aquilaria crassna* ? 159
Introduction du Chapitre 3 159
Etude histologique des cals d'*Aquilaria crassna* colonisés par les champignons lignivores *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* et *Antrodia vaillantii*. 161
RESUME 162
INTRODUCTION 163
MATERIEL ET METHODE 165
Mise au point de la méthode de production de cals à partir de feuilles d'*A. crassna* 165
Développement mycélien dans les cals d'*A. crassna* 166

Etude histologique 170
RESULTATS ET DISCUSSION 173
CONCLUSION 180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 181
Conclusion Générale et Perspectives 185
Une démarche expérimentale innovante pour la production d'agarwood en Guyane 186
Des résultats précurseurs dans la production d'agarwood de composition contrôlée, dans le respect de la biologie d'*Aquilaria* 187
L'agarwood en Guyane : du projet à sa réalisation 189
Références Bibliographiques Générales 195

LISTE DES TABLEAUX

A review of the conditions of worldwide agarwood production and development prospects in French Guiana.

Table 1 : The 21 species of the genus Aquilaria and their synonyms ("The Plant List", 2013). *23*

Table 2 : Examples of useful synonyms of agarwood in different countries, languages or cultures (Nakanishi el al., 1984; Jensen and Meilby, 2010; Blanchette et al. 2015; El Enshasy et al. 2019) *26*

Caractérisation des communautés fongiques associées à *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte en plantation en Guyane française.

Tableau 1 : Nombre d'UTO par niveau taxonomique. *65*

Tableau 2 : Liste complète des échantillons préparés pour l'extraction d'ADN et l'analyse en F-RISA, identifiés selon le lieu d'échantillonnage (géographique), la parcelle, le type, l'état de l'échantillon, la masse en grammes, et le nom de l'échantillon selon le positionnement de l'arbre sur la parcelle *82*

Tableau 3 : Liste des échantillons séquencés identifiés selon le lieu d'échantillonnage (parcelle et Localisation), l'état de l'échantillon et son nom en fonction de son positionnement sur la parcelle. *85*

Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction.

Tableau 1 : Identifications des arbres en fonction des différentes modalités. *104*

Tableau 2 : Détails des composés des échantillons de référence *134*

Tableau 3 : Détail des composés des échantillons de l'expérimentation d'inoculation par les champignons environnementaux *136*

Tableau 4 : Détail des composés des échantillons de l'expérimentation d'inoculation par les champignons lignivores de Guyane *137*

Etude histologique des cals d'*Aquilaria crassna* colonisés par les champignons lignivores *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* et *Antrodia vaillantii*.

Tableau 1 : Récapitulatif des observations réalisées après les colorations combinées de l'Acide Périodique-Schiff et du Naphthol-Blue-Black et au réactif de NaDi des coupes de cals sains et inoculés par les souches de PS, GT et AV. *179*

LISTE DES FIGURES

Introduction générale

Figure 1 : Photographies d'arbres d'Aquilaria à Cacao, en Guyane. *2*

Figure 2 : Les couleurs les plus foncées de l'agarwood présupposent sa bonne qualité, son parfum et sa forte valeur. *2*

Figure 3 : Dans une plantation, au Laos, les troncs d'Aquilaria sont criblés de trous pour faciliter l'administration de produits chimiques. *4*

Figure 4 : Les champs expérimentaux de plantations d'Aquilaria en Guyane se trouvent à Cacao (Roura) et Régina. *9*

Figure 5 : Plantations expérimentales d'Aquilaria âgées de 5 ans dans le village de Cacao, en alternance avec des agrumes (a) et à Régina (b), en Guyane. *10*

A review of the conditions of worldwide agarwood production and development prospects in French Guiana.

Figure 1 : Aquilaria spp. at Cacao plantation, in French Guiana Aquilaria spp. trees in the 5 year old experimental plantations are around 10 meters tall (a). *20*

Figure 2 : Pieces of old Agarwood to be sold. The darker and older, the more valuable is the wood. *26*

Figure 3 : Evolution of the number of Aquilaria sinensis hectares planted in 5 Chinese provinces between 2006 and 2010 (according to Yin et al. 2016) *31*

Figure 4 : The trunks of Aquilaria spp. trees in a plantation in Laos, drilled with holes to facilitate infestation by chemicals. *38*

Figure 5 : Aquilaria spp. at Cacao, in French Guiana. *42*

Caractérisation des communautés fongiques associées à *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte en plantation en Guyane française.

Figure 1 : Nombre de séquences brutes obtenues après séquençage (A) ; nombre de séquences conservées après traitement informatique (B) ; pourcentage de séquences conservées (C). *64*

Figure 2 : Courbe de raréfaction des sous échantillons (nombre des sous-échantillons = 50). *65*

Figure 3 : Prévalence des phyla. Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota et Rozellomycota ont des prévalences supérieures à 5 %. Ascomycota et Basidiomycota sont les principaux phyla. *66*

Figure 4 : Distribution des principaux genres de champignons sur l'ensemble des échantillons (Bois de Guyane, Bois du laos, Sol de la parcelle C). *67*

Figure 5 : Distribution des principaux genres de champignons sur les échantillons de bois de Guyane sains et blessés. *68*

Figure 6 : Distribution des phyla de champignons en fonction de la localité et de l'état des arbres prélevés. Le phyla majoritaire est celui des Ascomycètes. Celui des Basidiomycètes est particulièrement présent dans l'agarwood du Laos. *69*

Figure 7 : Distribution des principaux genres de champignons en fonction des différents types d'échantillons et de leurs états. *70*

Figure 8 : Distribution des principaux genres de champignons des échantillons de bois des arbres de Guyane en fonction de leur état, sain (T0) ou blessé (T1), pour les quatre parcelles expérimentale expérimentales de Guyane (A, B, C, P) *72*

Figure 9 : Diagrammes de Venn des distributions d'UTO fongiques totales, présentes dans les échantillons de bois de Guyane. *74*

Figure 10 : La Guyane se situe en Amérique du Sud, proche de l'équateur. Cacao se trouve en Guyane, au Sud-Ouest de Cayenne, sur la rivière La Comté. Régina se trouve au Sud-Est de Cayenne, au bord du Fleuve Approuague. D'après www.assistancescolaire.com et www.cartes-2-france.com *87*

Figure 11 : Le champ expérimental de Cacao est divisé en trois parcelles. *87*

Figure 12 : Le champ expérimental de Régina correspond à la parcelle P. *88*

Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction.

Figure 1 : Protocole d'inoculation par insertion des éprouvettes de bois (a à f), observations et découpe des arbres après 9 mois d'inoculation (g à i). *106*

Figure 2 : Pour inoculer les Aquilaria avec les champignons environnementaux, les arbres sont sélectionnés avec des troncs ayant minimum 3 fourches. *108*

Figure 3 : Représentation graphique des mesures de surfaces de propagation du bois noir dans les Aquilaria en plantation en Guyane *112*

Figure 4 : Proportions des différentes familles de structures moléculaires dans les échantillons de référence de bois noir et de bois blanc du Laos. *115*

Figure 5 : Pourcentages relatifs sur colonne apolaire des principaux composés volatils caractéristiques *115*

Figure 6 : Chromatogrammes des échantillons de références. De haut en bas : agarwood industriel, Bois noir Laos, Bois blanc Laos. *116*

Figure 7 : Proportions des différentes familles de structures moléculaires du bois noir présents chez les trois arbres de l'expérimentation d'inoculation (ACD-5-3, ACD-6-3, ACG 24-5) par application de terre (AT) et blessure de surface (ST). *118*

Figure 8 : Pourcentages relatifs sur colonne apolaire des principaux composés volatils caractéristiques du bois noir présents chez les trois arbres de l'expérimentation (ACD-5-3, ACD-6-3, ACG 24-5) d'inoculation par application de terre (AT) et blessure de surface (ST). *118*

Figure 9 : Chromatogrammes des échantillons de l'expérimentation d'inoculation par les champignons environnementaux *119*

Figure 10 : Proportions des différentes familles de structures moléculaires du bois noir présents chez les arbres inoculés avec les champignons lignicoles de Guyane *120*

Figure 11 : Pourcentages relatifs sur colonne apolaire des principaux composés volatils caractéristiques de l'agarwood présents chez les arbres inoculés avec les champignons lignicoles de Guyane *121*

Figure 12 : Chromatogrammes des échantillons extraits de certains arbres inoculés avec les champignons lignicoles de Guyane, dont les profils sont les plus proches de l'agarwood industriel . *122*

Figure 13 : Analyses en composantes principales (ACP) de la répartition des échantillons en fonction de leurs compositions chimiques. *124*

Figure 14 : Rendements en huile essentielle des différents types d'échantillons des expérimentations d'inoculation par des champignons environnementaux et par des champignons lignicoles de Guyane. *125*

Figure 15 : La Guyane se situe en Amérique du Sud, proche de l'équateur. Cacao se trouve en Guyane, au Sud-Ouest de Cayenne, sur la rivière La Comté. *138*

Figure 16 : Le site d'étude est une plantation expérimentale mise en place dans le village de Cacao, en Guyane. *138*

Figure 17 : Les étapes nécessaires pour la caractérisation moléculaire des champignons étudiés, de l'échantillonnage à l'identification moléculaire. *139*

Figure 18 : Exemple de culture de Pycnoporus sanguineus après ajout d'éprouvettes stérilisées de hêtre. *139*

Figure 19 : Photographies de chacune des conditions d'inoculation et des témoins après découpe selon la Figure 1.h & i. *140*

Figure 20 : Réaction d'exsudation après 6 mois (b) et 12 mois (c et d) de branches d'Aquilaria stressées avec de la terre (d) et sans terre (b et c). *141*

Détection rapide de l'agarwood et évaluation de sa composition chimique par spectrométrie proche infrarouge (SPIR)

Figure 1 : Présentation de la collection spectrale. *150*

Figure 2 : Analyse en composantes principales (ACP) des spectrogrammes des échantillons-contaminés par les différentes souches de champignons et des témoins de bois blanc et de bois noir d'agarwood du Laos. *151*

Etude histologique des cals d'*Aquilaria crassna* colonisés par les champignons lignivores *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* et *Antrodia vaillantii*.

Figure 1 : Production et multiplication de cals d'Aquilaria à partir d'explants foliaires. *166*

Figure 2 : Les étapes nécessaires à la caractérisation moléculaire des champignons étudiés. *167*

Figure 3 : Les différentes phases de purification d'un isolat issu d'un sporophore frais. *168*

Figure 4 : Mise en culture de cals d'Aquilaria crassna avec la souche de Gloeophyllum trabeum. ... *170*

Figure 5 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals sain d'Aquilaria crassna..... *174*

Figure 6 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals d'Aquilaria crassna inoculé avec le champignon Pycnoporus sanguineus *175*

Figure 7 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals d'Aquilaria crassna inoculé avec le champignon Gloeophyllum trabeum *176*

Figure 8 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals d'Aquilaria crassna inoculé avec le champignon Antrodia vaillantii..... *177*

INTRODUCTION GENERALE

Aquilaria Lam. est un genre d'arbre tropical de la famille des Thymelaeaceae, originaire de l'Asie du Sud-Est, notamment du Sud de la Chine, de l'Inde, du Cambodge, du Vietnam, de Malaisie, d'Indonésie et du Laos (Lee et Mohamed 2016b). Les arbres du genre *Aquilaria* sont des arbres sciaphyles qui poussent en sous-bois. Cet arbre peut s'élever à plus de quarante mètres de haut et son tronc à l'écorce blanc argenté peut atteindre les soixante centimètres de diamètre (Ansel 2019). La première description du genre *Aquilaria* (espèce *malaccensis*) a été effectuée par Lamarck en 1783, puis elle a été reprise par Hutchinson en 1924 et par Hou en 1960 (Lee *et al.* 2013).

Les feuilles sont de couleur vert foncé, couvertes d'une cuticule cireuse brillante, lorsqu'elles sont matures. Bien que leur forme exacte dépende de l'espèce (López-Sampson et Page 2018a), elles sont globalement de forme ovale. Les jeunes pousses sont vert-clair et peuvent tirer sur le jaune, si l'arbre est en déficit de nutriments. Les fleurs sont petites et jaunes, groupées en inflorescences velues. Les fruits sont des capsules à deux valves, également velues, mesurant 3-5 x 2-4 cm. Il y a une à deux graines par fruit ; les deux graines sont suspendues à un cordon ou funicule (Leti *et al.* 2013 ; Figure 1). Les graines ne sont dispersées qu'à quelques mètres de l'arbre adulte. Certains animaux pourraient cependant être à l'origine de la dispersion des graines (Soehartono et Newton 2001).

Ce genre compte actuellement vingt et une espèces (Lee *et al.* 2017) dont le bois sain est de couleur blanche. Lorsque l'arbre est blessé, la partie mise à nu est exposée à l'incursion des micro-organismes environnementaux. En interactions complexes avec ces derniers, notamment fongiques, l'arbre produit un bois transformé par sa forte teneur en composés secondaires, en réaction au stress lié à l'agression (Naziz *et al.* 2019). Ce bois transformé, appelé agarwood ou oud (Figure 2), est riche en molécules oxydables qui lui confèrent sa couleur noire, il présente donc une forte teneur en oléo-résines, composées notamment de chromones et de sesquiterpènes (Mohamed *et al.* 2010 ; Naef 2011). Sous l'effet de l'oxydation, sa densité augmente et il devient de plus en plus odorant au fil du temps.

Figure 1 : Photographies d'arbres d'*Aquilaria* à Cacao, en Guyane.
Les arbres d'*Aquilaria* des plantations expérimentales sont âgés de 5 ans et atteignent environ 10 mètres de haut (a). Les feuilles matures sont vert-foncé avec une cuticule brillante et de forme elliptique (b). Les fleurs sont petites, jaunes et regroupées en inflorescences velues (c). Les fruits sont des capsules à deux valves mesurant 3-5 x 2-4 cm (d), comportant une à deux graines, suspendues à un cordon ou funicule (e).

Figure 2 : Les couleurs les plus foncées de l'agarwood présupposent sa bonne qualité, son parfum et sa forte valeur.

L'agarwood (Figure 2) est particulièrement apprécié pour son odeur intense et boisée. Il est utilisé en tant qu'encens dans certaines cérémonies religieuses, ou pour la fabrication de bijoux ou d'objets aux connotations religieuses (Barden *et al.* 2000). L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation d'agarwood ou, dans une moindre mesure, de bois d'*Aquilaria* spp. non contaminé par les micro-organismes est également très prisée en parfumerie et dans certaines médecines traditionnelles, notamment chinoise, tibétaine et ayurvédique, pour ses propriétés sédatives et anticancéreuses, entre autres (Adam *et al.* 2017). Les feuilles sont également consommées en infusions, auxquelles sont attribuées beaucoup de bienfaits. En effet, bien que les infusions soient plutôt utilisées à des fins relaxantes ou digestives, elles sont utilisées en tant que panacées pour guérir ou prévenir de nombreux maux (maux de tête, douleurs musculaires, fatigue, etc.)

Ainsi, les produits issus d'*Aquilaria* sont très demandés sur le marché, notamment en Asie du Sud-Est et au Moyen-Orient. Aussi, la valeur commerciale des produits issus des arbres du genre *Aquilaria* est élevée, avec un marché mondial estimé, en 2018, pour toutes les espèces confondues, à 11 milliards d'US$. Il est à noter que l'huile essentielle d'agarwood est habituellement négociée entre 5 000 et 10 000 US$ par kilogramme, ce qui la place comme la plus chère des huiles essentielles sur le marché international. Pour les huiles reconnues de très haute qualité, cette valeur peut atteindre 40 000 US$ le kilogramme (El Enshasy *et al.* 2019).

La qualité de l'agarwood est déterminée par sa couleur, allant du plus clair (la plus faible qualité) au plus foncé (la meilleure qualité) et aussi par son parfum, qui dépend des composés secondaires qui le caractérisent. Dans beaucoup de pays d'Asie du Sud-Est, la qualité des huiles essentielles ne répond pas aux attentes du marché, car la culture de ces arbres n'est pas faite dans le respect de leurs exigences écologiques (Figure 3). En effet, pour stimuler la production d'oléorésine, beaucoup de planteurs d'Asie du Sud-Est injectent des produits de formulation empirique très variés dans des trous percés dans le tronc. Dans la plupart des cas, cette pratique nuit à la composition du produit de distillation (Blanchette *et al.* 2015 ; Chowdhury *et al.* 2016), et parfois, engendre la mort de l'arbre.

En tant que produit rare et cher, l'agarwood et, par là même, les arbres du genre *Aquilaria* ont été exploités de façon intensive et très peu contrôlée dans leur aire

d'origine. Ainsi, la totalité des espèces de ce genre sont classés en danger critique d'extinction par la Cites (CITES 2004).

Figure 3 : Dans une plantation, au Laos, les troncs d'*Aquilaria* sont criblés de trous pour faciliter l'administration de produits chimiques.
Cette pratique est nuisible pour les arbres mais aussi pour les produits de distillation, car elle altère la composition des huiles essentielles.

La stimulation de la production d'oléorésine par des méthodes inadaptées est un des problèmes que rencontre le marché de l'agarwood et des autres produits dérivés du genre *Aquilaria*. A cela s'ajoutent d'autres problèmes qui peuvent être classés de la façon suivante : i- le contrôle de la génétique de la plante, ii- la maîtrise de la conduite des plantations d'*Aquilaria*, iii- l'initiation de la production d'agarwood et sa maturation en interaction avec des micro-organismes sélectionnés qui doivent permettre d'obtenir un agarwood de très haute qualité et iv- les méthodes d'extraction des huiles essentielles.

i- L'identification des espèces des genres *Aquilaria* et *Gyrinops* Gaertn. reste délicate. En effet, les hybridations entre les différentes espèces du genre *Aquilaria* et également du genre *Gyrinops* sont très fréquentes et les réarrangements internes sont complexes, de telle façon qu'il est difficile de délimiter avec précision ces espèces (Andary *et al.* 2019). Ainsi, des études sont menées pour essayer d'établir des clés de détermination précises des espèces, que ce soit à partir d'observations morphologiques, notamment les ellipses de Fourier (López-Sampson et Page 2018a) ou le séquençage de l'ADN de ces espèces (Lee *et al.* 2017). Pour initier un programme de sélection variétale, afin d'améliorer la production d'*Aquilaria,* il est donc nécessaire de procéder à une caractérisation génétique et phénotypique des espèces, notamment pour leur capacité à produire de l'agarwood.

ii- La maîtrise de la conduite des plantations nécessite la sélection d'une variété – il s'agit souvent d'une espèce – reconnue pour son fort potentiel de production. Il s'agit, aussi, d'identifier d'autres espèces végétales qui leur seront associées au sein de la plantation, en fonction des services écologiques recherchés, tels que l'ombrage, la fixation d'azote, la production d'autres produits, comme les agrumes, dans une perspective de diversification de revenu. Cette approche implique l'acquisition d'une meilleure connaissance des conditions de croissance d'*Aquilaria* spp. dans ses environnements naturels et la mise en place de nouvelles plantations afin de tester différentes conditions d'établissement et de conduite des arbres. L'objectif est d'identifier les itinéraires agronomiques adaptés pour une production optimale des *Aquilaria*.

iii- En réponse à un stress, le plus souvent résultant d'une blessure, les arbres du genre *Aquilaria* réagissent par une biosynthèse et une accumulation de métabolites secondaires dans la zone concernée. Ces blessures favorisent l'infestation du bois blessé d'*Aquilaria* par des cortèges de micro-organismes, tels les champignons et les bactéries. Ce bois, résultant de l'interaction complexe entre un bois stressé et des micro-organismes est l'agarwood. En conditions naturelles, rares sont les arbres qui en produisent. Mais la demande d'agarwood sur le marché international est croissante, ce qui pose le problème d'une offre limitée. Pour pallier ce problème, des itinéraires techniques visant à induire la réaction de l'arbre et l'infestation par des micro-organismes environnementaux ont été développés (Naziz *et al.* 2019), notamment en Asie du Sud-Est, pour produire de l'agarwood de façon quantitative dans les arbres. Ces techniques, tels le criblage de clous, l'injection de produits chimiques ou de mélanges de micro-organismes, pour la plupart, génèrent un agarwood de faible qualité, voire aboutissent à la production d'huiles essentielles inutilisables du fait de la présence résiduelle des composés chimiques appliqués aux arbres pour induire leur réaction. Il convient donc de trouver les techniques les plus adaptées pour engendrer la réaction de l'arbre et de sélectionner les micro-organismes qui permettent la meilleure maturation possible de l'agarwood. Enfin, la détection *in situ* de l'agarwood reste un sujet de recherche. Par exemple, des essais de localisation des zones d'accumulation d'oléorésine par réflexion d'ondes sonores et ultrasonores sont en cours (Karlinasari *et al.* 2015).

iv- Enfin, les méthodes d'extraction des huiles essentielles doivent progresser afin d'extraire de façon optimale l'huile essentielle des agarwoods de composition contrôlée.

Le prix très élevé de cette matière première et la demande croissante sur le marché mondial d'un produit de qualité incitent à améliorer les capacités de production d'un agarwood, de composition chimique contrôlée, par les planteurs. En effet, l'aménagement des forêts naturelles est considéré actuellement comme un outil de conservation de la ressource et non comme un outil de production. Face à cette demande, plus particulièrement à celle d'agriculteurs guyanais originaires du Laos, très au fait des potentialités de l'agarwood et des autres dérivés d'*Aquilaria*, désireux de diversifier

leur activité, des plantations expérimentales d'arbres du genre *Aquilaria* ont été entreprises en Guyane (Figures 4 et 5).

Afin de permettre la réussite de cette initiative, le Cirad, établissement public français de Recherche Agronomique en Coopération Internationale pour le Développement durable des régions tropicales et méditerranéennes, la Collectivité Territoriale de Guyane (CTG), Guyane Développement Innovation (GDI) et l'Union Européenne par un Fond Européen de Développement Régional (FEDER), se sont associés, en partenariat avec les agriculteurs à l'initiative de ce projet. Ce projet, dont la phase II inclut cette thèse de doctorat est le projet Aquil@Guyane (Zaremski 2018). Il a pour objectif de mettre en place une filière guyanaise de production d'agarwood et d'autres produits dérivés d'*Aquilaria*, à partir de conditions de culture durable d'*Aquilaria.* Il intègre recherches et développement et s'inscrit dans une démarche de contrôle et de traçabilité des produits de la filière, de respect de l'environnement et du Protocole de Nagoya.

Développer une production d'agarwood de composition chimique contrôlée a aussi pour vocation de proposer de nouvelles alternatives en termes de production d'huiles essentielles face aux productions d'oléorésines réalisées à partir d'injections chimiques dans les plantations d'*Aquilaria* en Asie du Sud-est. En effet, cette méthode est particulièrement contestée par les parfumeurs occidentaux et les négociants de la péninsule arabique qui sont les principaux acheteurs au niveau international, en plus d'être très néfaste pour les arbres d'*Aquilaria* (Figure 3). Ainsi, par exemple, le marché d'huiles essentielles *Aquilaria* au Laos a montré, ces dernières années, une chute des ventes alors que la demande internationale va croissante et peine à être satisfaite.

De plus, cette initiative s'inscrit dans les objectifs de valorisation de la biodiversité dans un contexte de développement durable de la Collectivité Territoriale de Guyane. Ainsi, envisager, en Guyane, la production d'huiles essentielles et d'oléorésines à partir d'*Aquilaria* peut être un atout majeur pour l'économie de ce département français ultra-marin, d'autant que ce projet vise à produire une huile essentielle d'une composition chimique qui lui serait propre. En effet, pour une même espèce, la composition

chimique de l'huile essentielle varie en fonction des conditions climatiques, de la topographie, du type de sol (Chhipa et Kaushik 2017), entre autres, ce qui contribue à justifier la mise en place d'une filière guyanaise.

Enfin, la France d'outre-mer est responsable de la protection d'un important patrimoine écologique dont celui de la Guyane, qui est exceptionnel au niveau mondial. En introduisant, de façon contrôlée, par le biais du projet Aquil@Guyane, de nouvelles espèces d'arbres, appartenant au genre *Aquilaria,* qui est en danger à cause de sa surexploitation dans son milieu naturel en Asie du Sud-est, le projet permettra de conserver des génotypes et de participer ainsi à leur sauvegarde *ex situ*. En effet, le genre *Aquilaria* est classé à l'annexe II de la Cites : en danger d'extinction (CITES 2004).

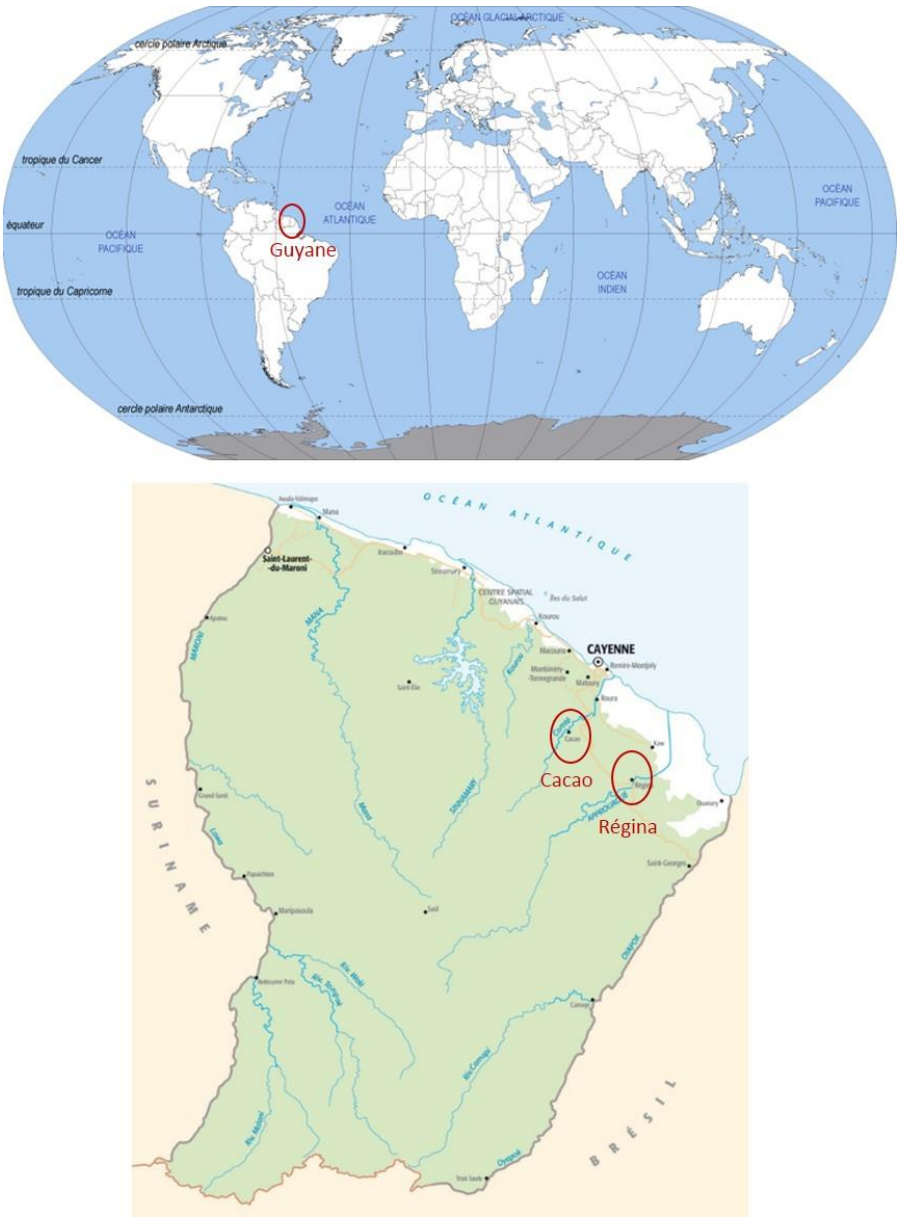

Figure 4 : Les champs expérimentaux de plantations d'*Aquilaria* en Guyane se trouvent à Cacao (Roura) et Régina.

Figure 5 : Plantations expérimentales d'*Aquilaria* âgées de 5 ans dans le village de Cacao, en alternance avec des agrumes (a) et à Régina (b), en Guyane.

Dans ce manuscrit, après un chapitre bibliographique relatant les conditions de production d'agarwood au niveau mondial puis l'intérêt d'établir des plantations d'*Aquilaria* en Guyane, trois chapitres expérimentaux présentent les travaux réalisés pour : i- Caractériser les compositions spécifiques des cortèges de champignons associées aux espèces d'arbres du genre *Aquilaria* présentes en Guyane, ii- Analyser les effets d'inoculation contrôlées avec des souches de champignons sélectionnées sur la production d'agarwood : évaluer de la composition en composés secondaires et iii- Observer *in vitro* l'interaction entre des souches de champignons sélectionnées et des cals d'*Aquilaria.*

Ainsi, le premier chapitre expérimental de la thèse décrit les communautés microbiennes associées aux arbres du genre *Aquilaria* en Guyane. Ces caractérisations ont été faites d'abord sur du bois sain, puis un suivi dans le temps des communautés microbiennes a été réalisé pour observer les éventuelles modifications de leurs compositions après que l'arbre ait été blessé. Ce suivi a été réalisé grâce à une technologie de séquençage haut débit (Illlumina Mi-Seq). Une analyse bio-informatique des données a été réalisée afin de caractériser les compositions des communautés microbiennes dans le bois blanc et leur évolution dans le bois après blessure. Le deuxième chapitre de la thèse traite de la stimulation de la production d'agarwood et de sa composition en composés secondaires. Dans ce cadre, des inoculations contrôlées avec des champignons lignivores de Guyane ont été réalisées en plantation sur des *Aquilaria crassna* âgés de 6 ans. Après neuf mois d'exposition, les arbres inoculés ont été abattus et le bois présentant des traces d'oléorésines a été récolté. Les composés ont été obtenus par hydro-distillation afin de les caractériser et les comparer avec ceux d'une oléorésine commerciale issue d'agarwood du Laos ainsi qu'avec ceux obtenus grâce à une autre méthode expérimentale d'induction de bois noir. En appui de ces travaux, des analyses en Spéctrométrie Proche InfraRouge (SPIR) ont été effectuées pour tester leur potentielle applicabilité en champs. Le troisième chapitre aborde la caractérisation histologique et histochimique de l'interaction de souches de champignons et *Aquilaria crassna*. Ainsi, des observations ont été réalisées sur des cals d'*Aquilaria crassna* pour mettre en évidence le développement du champignon sur et dans les cals d'*Aquilaria crassna.*

CHAPITRE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction du Chapitre bibliographique

Le travail précurseur à toute recherche est l'état de l'art relatif au domaine de recherche sur lequel porte cette recherche. Dans ce chapitre, nous avons réalisé l'état de l'art, actuellement instaurées dans le monde, des conditions de production de l'agarwood, bois issu de l'interaction complexe entre certains genres d'arbres de la famille des Thymelaeaceae et des cortèges de micro-organismes.

Après avoir décrit le genre *Aquilaria*, principal producteur d'agarwood, et présenté l'agarwood, nous avons montré que le commerce de celui-ci met en danger d'extinction de genre *Aquilaria*. De plus, nous avons mis en évidence que la qualité de l'agarwood n'est pas toujours la même en fonction de son mode de production et que sa production intense tend même à diminuer cette qualité. Forts de ces constats, nous avons démontré la pertinence de développer la production d'agarwood en Guyane.

Cet état de l'art a fait l'objet d'un article de revue soumis à la revue internationale « Biodiversity and Conservation » pour publication.

A REVIEW OF THE CONDITIONS OF WORLDWIDE AGARWOOD PRODUCTION AND DEVELOPMENT PROSPECTS IN FRENCH GUIANA.

Why develop agarwood production in French Guiana?

Clara ZAREMSKI[1], Claude ANDARY[2], Nadine AMUSANT[3], Georges MICHALOUD[4], Marc DUCOUSSO[5]

[1] CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France. AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France. clara.zaremski@hotmail.fr ; corresponding autor

[2] Retired from Faculty of Pharmacy, University of Montpellier and from CEFE, UMR 5175, CNRS, Montpellier, France / 17 rue des Millepertuis, 34830 Clapiers, France. claude.andary@gmail.com

[3] CIRAD - UMR ECOFOG AgroParisTech, CNRS, INRA, Université des Antilles, Université de Guyane Kourou; BP 701, 97387 Kourou Cedex, French Guiana. nadine.amusant@cirad.fr

[4] Retired from CNRS, UMR 5120 AMAP - CIRAD, Montpellier, France / 599 rue de Fontcouverte, 34070 Montpellier, France. michaloud@cirad.fr

[5] CIRAD - UMR 113, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Cirad/IRD/Inra/Agro-M/UM2 Campus international de Baillarguet - TA A - 82 / J, 34398 Montpellier Cedex 5, France. marc.ducousso@cirad.fr ; corresponding autor

ABSTRACT

Agarwood is a wood resulting from complex interactions between the wood of some trees species of *Aquilaria* and *Gyrinops* notably and diverse microorganisms, including fungi and bacteria. This wood has been used for millennia for its fragrance with warm and woody notes. It is marketed mainly in Asia and the Middle East in luxury perfumery. This modified wood, which takes time for the interactions between wood and microorganisms to occur, is rare and therefore expensive. As a result, agarwood is faced with problems related to rare products: overexploitation of the resource in the wild with predatory exploitation techniques of the resource but also resulting in a decrease in the quality of agarwood. To address these issues aiming in particular to further develop the agarwood market, research teams are exploring technical itineraries to produce more high quality agarwood. It is in this context that a project of *Aquilaria* plantations has been established in French Guiana. This project aims to enable the production of high quality agarwood under conditions that are ecologically and biologically close to natural production conditions while contributing to the *ex-situ* safeguarding of the critically endangered *Aquilaria* genus. The Aquil@guyane project is the result of collaboration between Guyanese farmers, the Territorial Collectivity of French Guiana and researchers from the French Centre for International Cooperation in Agricultural Research for Development (Cirad). This project has allowed the planting of several experimental plots in French Guiana, which will serve as a basis for selecting varieties of *Aquilaria* to produce high quality agarwood according to selected fungal strains from the Guianese environment.

Key Words: Agarwood, *Aquilaria*, Endangered species, Essential oil, French Guiana, Improvement, Microorganisms, Quality.

RESUME

L'agarwood est un bois issu d'interactions complexes entre le bois de certaines espèces d'arbres, *Aquilaria* et *Gyrinops,* notamment, et divers micro-organismes, notamment fongiques et bactériens. Ce bois est utilisé depuis des millénaires pour son parfum aux notes chaudes et boisées. Il est commercialisé principalement en Asie et au Moyen Orient dans la parfumerie de luxe. Ce bois modifié, qui demande du temps pour que les interactions entre le bois et les micro-organismes puissent se faire, est rare et donc onéreux. De ce fait, les problématiques liées aux produits rares se posent pour l'agarwood : surexploitation de la ressource en milieu naturel avec des techniques d'exploitations prédatrices de la ressource engendrant une diminution de la qualité de l'agarwood. Pour répondre à ces problématiques et à la croissance du marché de l'agarwood, des équipes de recherches étudient des itinéraires techniques pour produire plus d'agarwood de haute qualité. C'est dans ce cadre qu'un projet de plantations d'*Aquilaria* a été établi en Guyane. Ce projet a pour but de permettre la production d'agarwood de haute qualité, dans des conditions écologiquement et biologiquement proches des conditions naturelles de production tout en contribuant à la sauvegarde ex-situ du genre *Aquilaria*, en danger critique d'extinction. Le projet Aquil@guyane est issu d'une collaboration entre des agriculteurs guyanais, la Collectivité Territoriale de Guyane et des chercheurs du Centre français de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Cirad). Ce projet a permis la plantation de plusieurs parcelles expérimentales en Guyane, qui serviront de base pour la sélection de variétés d'*Aquilaria* productrice d'agarwood de haute qualité lorsqu'elles sont inoculées par des souches de champignons sélectionnées dans l'environnement guyanais.

INTRODUCTION

For thousands of years, women and men have been using plants for their fragrance. Indeed, plants possess a set of organic molecules that enable them to communicate. Plants produce secondary metabolites to communicate with each other within a stand to become aware of any danger or disease (Meyer *et al.* 2008). Plants secondary metabolites are useful for communicating with other living organisms such as vertebrates, insects, or fungi, notably mycorrhizae. Interactions *via* these compounds serve to disseminate pollen and seeds, or to defend plants and provide their nutrients. As demonstrated to us when we smell the fragrance of a flower or another plant organ, this communication occurs with its entire environment. Usually, humans perceive the smell of terpenes, like geraniol in roses, phenolic compounds such as vanillin, the odour of vanilla, or nitrogen and ammonia, these last molecules perceived as unpleasant (Meyer *et al.* 2008).

The secondary metabolites from which the different perfumes of interest for humans are derived come from all plant organs, depending on the species, some of which are presented in *L'Herbier Parfumé* (Ghozland and Fernandez 2010). Those of the rose usually come to mind (*Rosa* spp.) or lavender (*Lavandula* spp.) or even fruits, such as vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) or citrus fruits, fruits of the *Rutaceae*, such as lemon, orange or mandarin. Vegetative organs also produce some secondary metabolites of interest for their fragrance, such as mint leaves (*Mentha* spp.), ginger roots (*Zingiber officinale* Roscoe), or stem or trunk parts, such as the bark of the cinnamon tree (*Cinnamomum* spp.) or sandalwood (*Santalum* spp.). In addition, some species produce fragrant exudates or oleoresins. Such is the case with the Benjamin bush (*Styrax* sp.), which produces a gum-resin when wounded, with the rockrose (*Cistus ladaniferus* Stokes) for which high temperatures induce the production of a very

fragrant gum, with some species of *Burseraceae*, which, when wounded, produce incense or even ancient myrrh, a gum-oleoresin resulting from exudation of the trunk.

Since millennia, a modified wood has become the luxury in terms of perfume: Agarwood. This wood, resulting from a tree-stress driven reaction and complex interactions with microorganisms has become so popular that the existence of the tree species that produce it is in danger. That is why, we have considered here to present, after a state of the art on agarwood production, the problematic related to the exploitation of *Aquilaria* and the works that we put in place, including a plantation project in French Guiana.

AQUILARIA, DESCRIPTION OF A VULNERABLE GENUS

Figure 1 : *Aquilaria* spp. at Cacao plantation, in French Guiana *Aquilaria* spp. trees in the 5 year old experimental plantations are around 10 meters tall (a).
Shoots 1.5m from the ground bearing mature *Aquilaria* spp. leaves on a 5-year-old (b). The shape and size of the leaves depend on the species, though they are usually elliptic-oval. Flowering stems, with several *Aquilaria* spp. inflorescences on a 5-year-old tree (c). The flowers are small and yellow, grouped in axillary inflorescences in velvety umbels. *Aquilaria* spp. fruits are capsules with 2 valves, measuring 3-5 x 2-4 cm (d). There are 1 or 2 seeds per fruit (e).

The first description of the genus *Aquilaria* (with *Aquilaria malaccensis* Lam) was made by Lamarck in 1783, revisited by Hutchinson in 1924 and by Hou in 1960 (Lee *et al.* 2013). Thanks to certain studies, it can be seen that the different species of *Aquilaria* are identifiable fairly easily with their vegetative traits (Lee *et al.* 2013). This is quite encouraging, given that these trees do not usually flower before their sixth year, and only once a year. Most of the identifications are morphological, with the study of flowers, fruits and leaves. However, some studies, including the one by

Lee and Mohamed (2016a), were also based on comparing fragments of sequences coding for the internal transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA. That study (Lee and Mohamed 2016a) led to the discovery of a new species, *Aquilaria rostrata*. The trees of the genus *Aquilaria* can measure between 10 and 30 metres (Leti *et al.* 2013; Figure 1.a). The leaves are dark green, covered with a glossy, waxy cuticle when mature (Figure 1.b). Young shoots are pale green and can border on yellow if the plant is growing on soils poor in nitrogen. The shape and size of the leaves depends on the species (López-Sampson 2017), though they are generally elliptical-oval. The flowers are small and yellow, grouped in axillary inflorescences in the form of velvety umbels (Figure 1.c). Their calyx is persistent during germination. The fruits are capsules with two valves measuring 3-5 x 2-4 cm (Figure 1.d). There are 1 or 2 seeds per fruit (Figure 1.e). They are black and only dispersed a few metres from the adult tree. However, certain animals (Soehartono and Newton, 2001b) may disperse seeds. The same authors specified that over 50% of seeds germinate. This proves that growing *Aquilaria* trees from seed is sound in terms of cultivation (Blanchette *et al.* 2015). The trees start bearing fruits at around 7 years old. Fruiting takes place once a year, in the monsoon season, between June and August (Soehartono and Newton 2001b). Seeds germinate under the mother-trees. Consequently, intensive exploitation of these trees endangers the natural regeneration of wild stands.

According to the classification by Watson and Dallwitz (1992), the genus *Aquilaria* belongs to the family of the *Aquilaria*ceae, which comprises 32 species, divided into 6 genera: *Aquilaria*, *Gyrinops*, *Gyrinopsis*, *Microsemma*, *Octolepis* and *Solmsia*. However, the classic and phylogenetic classifications do not agree with that classification and place the genus *Aquilaria* in the family of the Thymelaeaceae. This family contains 500 species grouped into around fifty genera, most of which are found in the

tropical environments of Asia, Africa and Australia. For instance, according to the APG IV classification (The Angiosperm Phylogeny Group *et al.* 2016), the genus *Aquilaria* Lamarck belongs to the family of the Thymelaeaceae, order of the Malvales, Eudicots. It can also be seen that, according to "The Plant List" (2013), some species of the genus *Aquilaria* have one or more species of the genus *Gyrinops* as a synonym (Table 1). In 2005, Eurlings and Gravendeel published a set of *Trn*l-*trn*F sequences whose analysis indicates that the genera *Aquilaria* and *Gyrinops* are paraphyletic. Notwithstanding, these authors have not yet proposed to transfer species of the genus *Gyrinops* into the genus *Aquilaria*. There are few genetic variations in the species of the genus *Aquilaria* (Lee *et al.* 2017). For instance, for a long time only 15 species of the genus *Aquilaria* were inventoried (Barden *et al.* 2000), and 17 endemic species of *Aquilaria* were listed by Mabberley (2008). Then, 27 species were inventoried across the world, 24 of which were from 12 countries of Southeast Asia. Following a debate on the number of species in the genus (Lee and Mohamed 2016a), 21 species are inventoried today (Lee *et al.* 2017), including *Aquilaria rostrata* Ridl., which was assumed to be extinct and whose individuals were found in a natural forest (Lee and Mohamed 2016a). These 21 species, along with their synonyms, are listed on the international plant referencing site "The Plant List" » (Table 1).

Table 1 : The 21 species of the genus *Aquilaria* and their synonyms ("The Plant List", 2013). *Aquilaria apiculata* Merr., *Aquilaria baillonii* Pierre ex Lecomte, *Aquilaria banaensis* P.H.Hô, *Aquilaria decemcostata* Hallier f., *Aquilaria khasiana* Hallier f., *Aquilaria rostrata* Ridl., *Aquilaria rugosa* K. Le-Cong & Kessler, *Aquilaria subintegra* Ding Hou and *Aquilaria yunnanensis* S.C.Huang have no synonyms.

Name	**Synonym**
Aquilaria beccariana Tiegh.	*Aquilaria cumingiana* var. *parvifolia* Airy Shaw *Aquilaria grandifolia* Domke *Gyrinopsis grandifolia* (Domke) Quisumb.
Aquilaria brachyantha (Merr.) Hallier f.	*Gyrinopsis brachyantha* Merr.
Aquilaria citrinicarpa (Elmer) Hallier f.	*Gyrinopsis citrinicarpa* Elmer
Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte	*Aquilaria crasna* Pierre
Aquilaria cumingiana (Decne.) Ridl.	*Aquilaria pubescens* (Elmer) Hallier f. *Decaisnella cumingiana* (Decne.) Kuntze *Gyrinopsis cumingiana* Decne. *Gyrinopsis cumingiana* var. *pubescens* Elmer *Gyrinopsis pubifolia* Quisumb.
Aquilaria filaria (Oken) Merr.	*Aquilaria acuminata* (Merr.) Quisumb. *Aquilaria tomentosa* Gilg *Gyrinopsis acuminata* Merr. *Pittosporum filarium* Oken
Aquilaria hirta Ridl.	*Aquilaria moszkowskii* Gilg
Aquilaria malaccensis Lam.	*Agallochum malaccense* (Lam.) Kuntze *Aloexylum agallochum* Lour. *Aquilaria agallochum* (Lour.) Roxb. Ex Finl. *Aquilaria moluccensis* Oken *Aquilaria secundaria* Rumph. Ex DC. *Aquilariella malaccensis* (Lam.) Tiegh.
Aquilaria microcarpa Baill.	*Aquilaria borneensis* (Tiegh.) Gilg *Aquilariella borneensis* Tiegh. *Aquilariella microcarpa* (Baill.) Tiegh.
Aquilaria parvifolia (Quisumb.) Ding Hou	*Gyrinopsis parvifolia* Quisumb.
Aquilaria sinensis (Lour.) Spreng.	*Agallochum grandiflorum* (Benth.) Kuntze *Agallochum sinense* (Lour.) Kuntze *Aquilaria chinensis* Spreng. *Aquilaria grandiflora* Benth. *Aquilaria ophispermum* Poir. *Ophispermum sinense* Lour.
Aquilaria urdanetensis (Elmer) Hallier f.	*Gyrinopsis urdanetense* Elmer *Gyrinopsis urdanetensis* Elmer

Trees of the genus *Aquilaria* are native to Southeast Asia. The countries outside Southeast Asia where *Aquilaria* trees were introduced first are South Africa and Australia (Chakrabarty *et al.* 1994; Barden *et al.* 2000). They are evergreen sciaphilous under-storey trees, found in certain rainforests of this geographical range. They can live on various soils: stony, sandy, calcareous, on slopes or ridges, or in wetlands (Barden *et al.* 2000). According to these authors, different species appear to be distributed according to the country. For instance, *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte is exploited in Laos, Cambodia and Vietnam, whilst that is not the case of *Aquilaria malaccensis*, which is exploited rather in Malaysia (Barden *et al.* 2000; Jensen 2009; Lee *et al.* 2013). The main species of *Aquilaria* have mostly been described morphologically for differentiation purposes. However, some genetic studies have shown that genetic diversity is linked more to geographical factors (Lee *et al.* 2011). These authors found that the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique is efficient in genetically differentiating between the different species of *Aquilaria,* while the Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) technique, which is derived from the RAPD technique, is ideal for determining to which species a plant of the genus *Aquilaria* belongs.

The most widely studied species remains *A. malaccensis,* as shown by many studies, particularly those by Barden *et al.* (2000), Soehartono and Newton (2000), Soehartono and Newton (2001a, b), Lee *et al.* (2013), Tajuddin *et al.* (2016), Lee *et al.* (2017) among others. Moreover, it was the first *Aquilaria* species to be listed as an endangered species in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES, 2004). However, it is not the only *Aquilaria* species of interest, but as each species is specific to a geographical location, the teams originating from a country generally work on the species nearest to them,

geographically. For example, some Chinese teams like Zhou *et al.* (2008), Yin *et al.* (2016) and Chen *et al.* (2017) mostly works on the species *A. sinensis* (Lour.) Spreng. The Malaysian team of Rozi Mohamed more particularly works on *A. malaccensis,* and Jensen and Meilby (2008 and 2010), have focused their research on *A. crassna* in Laos, where almost 80% to 90% of the agarwood collected comes from trees of that species. *Aquilaria crassna* is the species growing in the centre of Thailand, in Cambodia, Laos and Vietnam (Zhang *et al.* 2008).

The wood of *Aquilaria* spp. is of interest to exploiters for the blackened wood it produces after wounding and colonization by microorganisms: agarwood. This interaction is favoured by a hot, humid climate, which enables the growth of certain fungi (Sen *et al.* 2017). The trees of this genus are also acknowledged for their ability to depollute soils, by fixing heavy metals (Rajoo *et al.* 2013), with their roots apparently able to fix iron, and their branches cadmium. Trees of the genus *Aquilaria* could be used for plant-based remediation of polluted soils.

AGARWOOD, A WOOD CONSIDERED AS ONE OF THE MORE PRECIOUS IN THE WORLD

Figure 2 : Pieces of old Agarwood to be sold. The darker and older, the more valuable is the wood.

Table 2 : Examples of useful synonyms of agarwood in different countries, languages or cultures (*Nakanishi et al.*, 1984; Jensen and Meilby, 2010; Blanchette *et al.* 2015; El Enshasy *et al.* 2019)

Name	**Country**
Agar	Hindi
Agaru	Tibetans
Akil	Tamil
Aloeswood	Hong Kong
Ch'en Hsiang	Chinese
Chenxiang	Chinese
Denhal oudh	Arabic
Eaglewood	Europe
Gaharu	Malay
Jinkoh	Japanese
Kanankoh	Japanese
Mai dii	Laos
Mai khaww	Laos
Mai khilai	Laos
Mai phaktoo	Laos

Agarwood is also known under many other names, which some examples are referred in Table II. Agarwood has been used for centuries (Blanchette *et al.* 2015; Figure 2) and has been cited for millennia by authors, notably for its odorous properties. *Pedanius Dioscorides* of *Anazarbus* (1st century AD) referred to it in his *De Materia Medica*, where, under the name Agallochon, he explains the uses at that time of *Aquilaria agallocha* Roxb., which is in fact often assimilated to *Aquilaria malaccensis*, as a mouthwash, or in perfume. Agarwood is mainly used as perfume and incense, and in traditional medicine (Barden *et al.* 2000) particularly Ayurvedic, Tibetan, Chinese, Indian and other Southeast Asian medicines. The trees secrete the resins, which composes agarwood as defence reaction when the tree is wounded. Close to the wounds, volatil compounds are accumulated and turn the wood into agarwood. But, the agarwood formation is also due to infestation of some micro-organisms notably fungi (Tan *et al.* 2019).

The trees producing agarwood are certain trees of the genus *Aquilaria* and those of the genus *Gyrinops*, which are both Thymelaeaceae (Blanchette *et al.* 2015), with similar characteristics (Subasinghe and Hettiarachchi 2013; Andary *et al.* 2019). Blanchette *et al.* (2015) found that the xylem of trees of the genus *Aquilaria* has specific cells that produce the resin that lies behind agarwood. Yin *et al.* (2016), *via* the histology of *Aquilaria* wood, also demonstrated that it is microscopically possible to differentiate between "true" agarwood, extracted from *Aquilaria* trees and "false" agarwood, often from the genera *Strychnos* (Loganiaceae) and *Memecylon* (Melastomataceae). The degree of coloration in healthy *Aquilaria* wood, which is pale beige and then blackens to form agarwood, depends on the age of colonization by parasites.

The older the colonization, the darker is the colour of the agarwood (Mohamed *et al.* 2014).

According to Barden *et al.* (2000), only 10% of *Aquilaria* spp. trees produce agarwood naturally, though the conditions for such production have never been formally identified. For instance, some authors endeavoured to identify some developmental stages of the tree that were critical for agarwood production. For Gianno (1986), the tree needs to be a least 20 cm in diameter at breast height (DBH). For Sadgopal (1960), the tree must be at least 50 years old and for Chakrabarty *et al.* (1994), at least 20. However, this does not seem relevant, as pointed out by Barden *et al.* (2000), who quoted work undertaken in Vietnam showing that, in fields, the trees can begin developing agarwood as early as 3 years old and that many variations exist, notably depending on environmental and genetic conditions (Ng *et al.* 1997). In addition, the yield and quality of agarwood from *Aquilaria* spp. trees are not stable and are highly dependent on the individual trees. For Barden *et al.* (2000), one way of identifying trees that produce agarwood is to identify trees at the end of their life. Indeed, as trees that produce agarwood have been wounded and/or infested by fungi, it can be imagined that dying trees are under similar conditions, hence potential agarwood producers. This raises a problem of how trees can be selected before cutting them down. Some peoples of Indonesia, such as the Dayaks, claim that they can judge whether a tree is infected from certain physical traits, notably dead fruits and yellowing leaves (Soehartono and Mardiastuti 1997; Barden *et al.* 2000). Recently, some authors discovered a way of detecting agarwood in trunks by listening to the resonance of the tree trunk (Karlinasari *et al.* 2015).

The agarwood used as perfume goes back millennia in the Middle East, India and Asia. Moreover, López-Sampson and Page (2018b) exhaustively listed the uses of

agarwood, depending on the countries, from the first accounts of its use to the present day. They revealed that references to this perfume are found in most of the reference texts of the different religions and also that, while agarwood trading is ancestral in most Asian and Middle Eastern countries, it has also existed in Europe since the spice trade route was established in the 14th century. Since the 1990s, western perfumers have shown an increasing interest in agarwood, such as Christian Dior with "Oud" from the Precious Elixirs collection, along with "Oud Ispahan", "M7 – Oud Absolu" by Yves Saint Laurent and "Tobacco Oud" by Tom Ford. However, it is since 1975 that agarwood essential oil has become more affordable and purchased by Arab countries (Jensen and Meilby 2010). This rise in trade, since the 1980s, coincided with the end of the Second Indochina War, according to Jensen and Meilby (2010). Agarwood incense is used in Buddhist rites in Asia and in Muslim rites (Chakarbarty *et al.* 1994; Blanchette *et al.* 2015). The incense burnt is either the actual wood or conditioned for the purpose in the form of powder or chips (Barden *et al.* 2000). According to these authors, agarwood is also used in certain funeral rites. In traditional medicines, especially Chinese and Ayurvedic, essential oil of agarwood is used as a sedative (Liu *et al.* 2008), as a detoxifier and against digestive problems, sore throats, or for its anaesthetising properties. It is also used to reduce swelling, for female genital disorders and palpitations (Chakrabarty *et al.* 1994). It is also reported to have active ingredients that help to prevent cancer (Adam *et al.* 2017). Agarwood also serves for other purposes: insecticide, food flavouring, or cosmetics (Nurdiyana 2008). Pieces of agarwood have also been used as a medium for the recording of certain religious or magical texts. Worth mentioning is the *Pormuniyan*, a compendium of medical/magical recipes from Sumatra, at the *Bibliothèque Nationale de France*. Agarwood is also

used for jewellery or ornaments due to the zebra-like appearance afforded by its inclusion in healthy wood. Agarwood cannot be used as timber because it is not dense enough (Barden *et al.* 2000).

HOW TRADING AGARWOOD GOES TO ENDANGER *AQUILARIA* TREES

For millennia, agarwood has been produced from trees of the genus *Aquilaria* in its natural environment, i.e. the rainforests of Southeast Asia. In those forests, the exploiters particularly target *Aquilaria* spp. trees according to their age, focusing initially on older or wounded trees. As agarwood is highly prized, exploiters particularly target these trees. However, the ways of confirming the existence of agarwood in the trunk are mostly random: observing the trunk, tasting the leaves, the height of the tree, the trunk diameter at breast height, and other visual aspects, despite the fact that, for some years, detection methods using the propagation of sound waves or ultrasound waves (Karlinasari *et al.* 2015) have been tested to detect agarwood in *Aquilaria* spp. trees. As the demand for agarwood essential oil is growing, projects have been launched to grow *Aquilaria* spp. in fields in many Southeast Asian countries: Thailand, Vietnam, Cambodia, Laos, Malaysia, Indonesia, India and China. Thus, at the moment, most *Aquilaria* spp. trees earmarked to produce and exploit agarwood are located in Asia (Azren *et al.* 2019). For example, for China, Yin *et al.* (2016) inventoried 5,285 hectares of *A. sinensis, A. crassna* and *A. subintegra* plantations set up in 2010, in the provinces of Guangdong, Guangxi, Hainan, Fujian and Yunnan. Thanks to the data provided by those authors (Figure 3), it can be seen that the number of hectares planted with these three *Aquilaria* species in these provinces increased by 155% between 2006 and 2010. This coincides with the growing demand for

agarwood essential oil, fuelled by the world political and economic context seeking to foster international exchanges and set in place new trading channels. This trade on the agarwood market is a particular boost for certain countries in Southeast Asia and the Middle East.

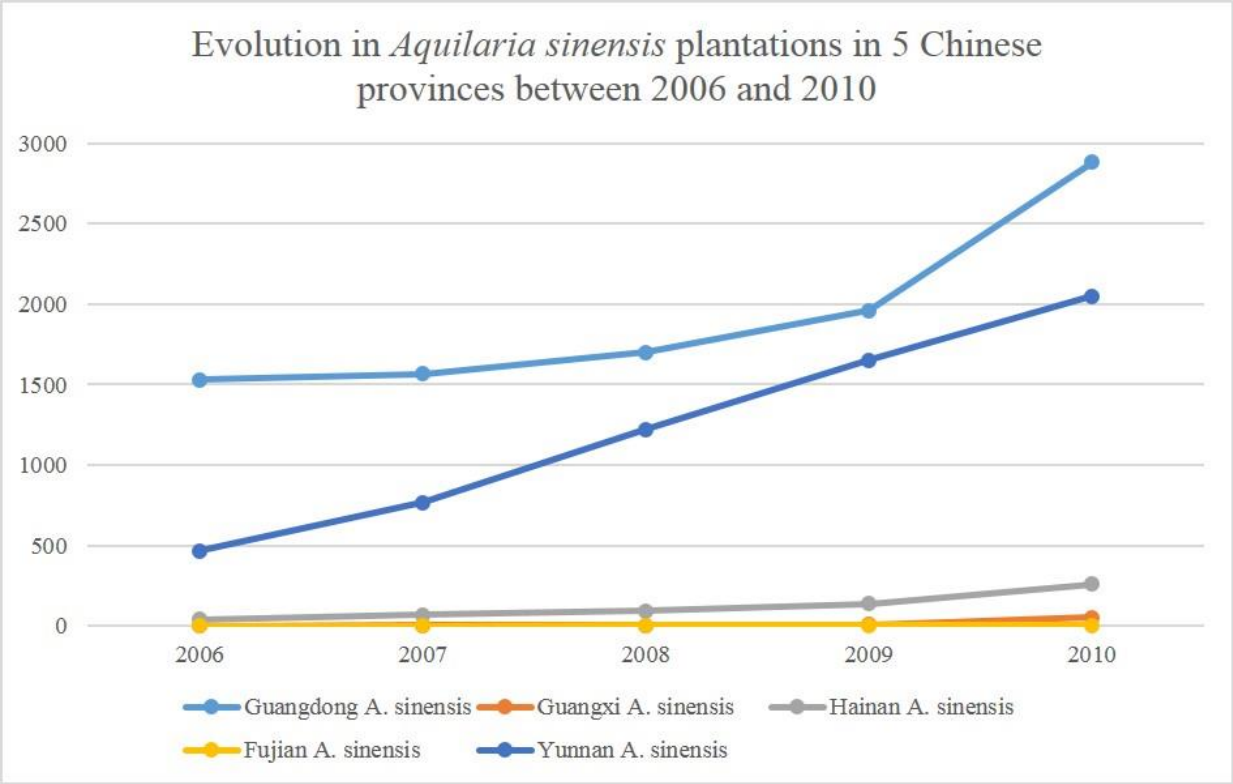

Figure 3 : Evolution of the number of *Aquilaria sinensis* hectares planted in 5 Chinese provinces between 2006 and 2010 (according to Yin *et al.* 2016)

Agarwood has been exploited and traded since at least the 13th century. At that time, India was the largest exporter. Between the 1980s and 2000s, Indonesia was the largest agarwood producer (Soehartono and Newton 2001a). In turn, Indonesia and Malaysia also export today and are considered to be the largest exporters (Barden *et al.* 2000). The producers of agarwood are Indonesia, Malaysia, Vietnam, Cambodia, Thailand, Laos and northeastern India (Kalita *et al.* 2015; Sen *et al.* 2017). The buyers are mostly the countries of the Middle East (Saudi Arabia and the United Arab Emirates) and the Far East (Hong Kong and Taiwan; Liu *et al.* 2017). Pieces of agarwood or chips are sold for several hundred USD per kilogram. The lowest price is

around 30 USD per kilogram and the highest around 10,000 USD per kilogram (El Enshasy *et al.* 2019). The essential oil is sold for between 5,000 and 10,000 USD per kilogram (Barden *et al.* 2000; Blanchette *et al.* 2015) and very pure essential oil costs up to 40,000 USD per kilogram (El Enshasy *et al.* 2019). Agarwood is the most expensive perfume wood, ahead of Sandalwood, Rosewood or even Guaiac, for example. The trade is in wood, chips, powder and essential oil, along with certain end-products such as incense and perfumes (Barden *et al.* 2000). The market value of agarwood depends on several factors: the country of origin, the depth and durability of the fragrance, wood density, resin content and type of wood (Barden *et al.* 2000). For example, according to Blanchette *et al.* (2015), the best agarwood comes from Bhutan, while some Lao farmers informed us that, for them, species is worth more than the geographical origin. However, Liu *et al.* (2017) pointed out that determining the value of agarwood is highly variable and notoriously subjective. An inventory by Lee and Mohamed (2016b) on quality levels depending on the countries involved in the agarwood trade showed that, granted, some quality criteria are country-based, notably the glossy black colour of the agarwood and the advanced age of the tree from which it came, but some other criteria are even more dependent on the country, such as the type of agarwood inducer in the *Aquilaria* spp. trees, or criteria linked to the fragrance of the agarwood. Whatever the case, agarwood is a luxury good, with high added value, in both its raw and processed state. Despite having an assuredly established place on the market, recent and precise marketing data with the monetary exchange figures are more difficult to access, even if authors, like Chowdhury *et al.* (2017), relate some estimations about global market for agarwood oil around 7 billion of USD in 2013 and 36 billion of USD in 2017. This happens quite often, where trade in high-added value products is involved and where transactions are very discreet for fiscal optimization

purposes. Such opacity is common for very high added-value cash crops. For example, in Western Europe, despite recent effort to make it cleaner, a lack of transparency is still found for the truffle sector.

It is the characteristics of this agarwood trade that make that the species of the genus *Aquilaria* are subjected to deforestation and over-exploitation in their areas of origin. For a long time, only *A. malaccensis* was listed in CITES Appendix II. However, poaching of other species of *Aquilaria* has existed for years notably that of *A. crassna*, through regular removal of blackened wood or unauthorized cutting of the tree to seek agarwood (Blanchette *et al.* 2015). Naziz *et al.* (2019) precise that, in global trade, *Aquilaria malaccensis*, *Aquilaria crassna* and *Aquilaria filaria* are shared around 87% of the global trade of *Aquilaria* genus. Illegal trading in wood is widespread, which is seriously threatening the species, particularly in protected zones and natural parks. The problem also arises from the fact that, recently, in addition to cutting just blackened wood, hence colonized by various microorganisms, wood is being cut from healthy trees and sold as powder or chips. This trade has led farmers, but also some investors, to set up *Aquilaria* spp. plantations, firstly in Southeast Asian countries (Blanchette *et al.* 2015), then in Australia (Page and Awarau 2012) and, much more recently, in French Guiana (Zaremski *et al.* 2017). Some Indian farmers grow *Aquilaria* spp. to produce and market agarwood (Mitra and Gogoi 2001). Moreover, in that region they are often planted alternately with other plants: teak, banana, oil palm, rubber (Blanchette *et al.* 2015). That alternation is being applied in French Guiana, with *Citrus* species. Information on how *Aquilaria* spp. reproduces is essential because, without that information, exploiting *Aquilaria* spp. trees sustainably in their natural environment seems unachievable over the long term (Soehartono and Newton 2001a, b); this information will also be indispensable

for setting up a varietal selection programme. At the moment, all *Aquilaria* species are listed in CITES Appendix II (Zhang *et al.* 2008) as highly endangered species. The genus *Aquilaria* as a whole is under threat of extinction, as indicated by its presence on the CITES lists, where it is classed as a threatened genus on the red list (Lee *et al.* 2017). This is why it is important to manage sustainable exploitation in natural environment (Jensen and Meilby 2008). In addition, ancient trees are very rare (Blanchette *et al.* 2015) and they are now only found in protected areas.

QUALITY OF AGARWOOD AND PERSPECTIVES OF IMPROVEMENT

Not all the trees of the genus *Aquilaria* produce agarwood, either in their natural environment or in field plantations. Indeed, agarwood production arises as a result of plant reaction after wounding, with subsequent colonization by microorganisms (Barden *et al.* 2000). For example, the percentage of trees affected in Indian plantations is less than a third of all trees planted (Kalita *et al.* 2015). In reaction to those micro-organisms (fungi and bacteria), wood from *Aquilaria* trees reacts and produces phytoalexins such as terpenoids, glycosteroids and alcaloidal compounds. These productions go to the formation of agarwood resin (El Enshasy *et al.* 2019). Terpenes produce by agarwood are classified like phytoalexins which operate against micro-organisms and insects (Banerjee *et al.* 2006). Tan *et al.* (2019) describe 3 different types of Agarwood formation: natural factors, conventional artificial methods, non-conventional artificial methods. These authors precise that natural factors are those that can happen in natural forests like wounds by broken branches, animal grazing, diseases or infestations while artificial methods are human wounds. According to Kalita *et al.* (2015), the agarwood results obtained by artificial inoculation were less

satisfactory. They found that the main cause would appear to be the non-involvement of the lepidopteran borer *Zeuzera conferta* Walker in those trials. According to Kalita *et al.* (2015), in their natural state, the trees of *A. malaccensis* that are colonized by fungi are trees that are infested by *Z. conferta*. The larva of that moth bores vertical galleries and would appear to help fungal colonization to spread. According to the same authors, agarwood can form without assistance from *Z. conferta*, but the quality of the resulting agarwood is apparently not the same as that resulting from the action of the insect.

As pointed out by Kalita *et al.* (2015), the particularity of trees of the genus *Aquilaria* is that they do not have resin-bearing ducts or glands that produce oleoresin. Thus, in the case of *Aquilaria*, oleoresin production results from an interaction between a plant and fungal microorganisms. According to several authors (Soehartono and Mardiastuti, 1997; Barden *et al.* 2000; Mohamed *et al.* 2010), the fungal genera colonizing trees of the genus *Aquilaria* are *Aspergillus* spp., *Botryodyplodia* spp., *Diplodia* spp., *Fusarium bulbiferum*, *Fusarium laterium*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium* spp. and *Pythium* spp. *Lasiodiplodia theobromae* is constantly present in *Aquilaria* spp. trees, while the proportions between *Fusarium solani* and *Cunninghamella bainieri* seem to depend on the tree. It may be that the last two compete with each other (Mohamed *et al.* 2014). Other authors, including Monggoot *et al.* (2017) and Zaremski *et al.* (2017 and 2018), identified certain endophytic fungi, such as *Arthrinium* spp. Monggoot *et al.* (2017) showed that some endophytic fungi of *Aquilaria subintegra* Ding Hou can produce volatile compounds of interest identical to those of their host. Those authors identified thirty-three endophytic fungal strains like *Arthrinium* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp. and *Diaporthe* spp. It is on the last one that the

authors mostly focused their studies. The secondary compounds identified here are mainly sesquiterpenes, which are induced by stress in *Aquilaria* spp. (Naziz *et al.* 2019) and are compounds of interest in agarwood, as oxo-agarospirol, beta-agarofuran, alpha-agarofuran, beta-dihydrofuran and delta-eudesmol. These endophytic fungi are grown on chips from healthy seven-year-old trunks. After 20 days' incubation, the strains produce a creamy, black exudate. In *Azadirachta indica*, it has already been shown that volatile compounds are produced by the host and by the endophytic fungus. According to Mohamed *et al.* (2014), fungal communities would appear to prefer trees growing in shadier and damper environments, particularly in the undergrowth, a preferred habitat of trees from the genus *Aquilaria*. More precisely, according to Mohamed *et al.* (2014), wounding the tree induces agarwood production, but interactions with accompanying fungi prolongs, intensifies and improves production.

The oleoresin of agarwood is complex and is composed of several molecules, around 150: sesquiterpenes, chromones, fatty acids and phenolic compounds (Mei *et al.* 2010; Naef 2011; Blanchette *et al.* 2015). Agarwood includes volatile molecules that yield essential oil (registered as agarwood HE: CAS 94 94350-09-1) obtained by hydrodistillation. Agarwood also includes non-volatile or poorly volatile molecules, often water soluble, which are extracted with organic solvents such as ethanol, methanol and acetone, or water. For oleoresin, the extraction with polar solvents makes it possible to obtain terpene molecules, essentially sesquiterpenes, and chromones. Oleoresin does not include monoterpenes (Naef 2011), found mainly in herbaceous plants rich in essential oils, but it also includes simple aromatic compounds, fatty acids and volatile phenols. The sesquiterpenes are of the Cadinan, Eudesman or Guaian type. 2- (2-phenylethyl) –chromones, extracted by polar

solvents, are characteristic chromones from agarwood. The most oxidized chromones such as 5,6,7,8 tetrahydro-2- (2-phenylethyl-chromones) are specific to agarwood and are good markers of authenticity and quality. These molecules are largely responsible for the balsamic, suave and warm fragrance, especially when the wood is heated or burned. Sesquiterpenes are heat resistant and start to decompose only above 500°C (Naef 2011). The sesquiterpenes such as: aromadendrene and baimuxinal are among the key molecules for determining agarwood quality. The "Kanankoh" quality (in Japan, Table II), which is the highest quality, contains up to 60% chromones, compared to the much lower quality "Jinkoh" (Japan) with 1.5% chromones. In 1984, Nakanishi *et al.* identified three sesquiterpenes as being major compounds of agarwood from *A. malaccensis*: alpha-agarofuran, 10-epi-gamma-eudesmol, which is also found in the essential oils of Geranium and Vetiver, and oxo-agarospirol, in addition to the other compounds identified by Bhattacharyya *et al.* (1952). Callus cultures also revealed the existence of alkanes and young plants unaffected by fungi contained squalenes, for which the rate decreased after infection, being reutilized to biosynthesize the sesquiterpenes that are typical of agarwood (Sen *et al.* 2017).

The Chinese word for agarwood (*Ch'en Hsiang* / *Chenxiang* / *Chen Xiang*) means "sinking wood" (Barden *et al.* 2000), referring to its high essential oil content assumed to make the wood heavier and causing it to sink, considered as token of its quality (Liu *et al.* 2017). This quality is also visible when the wood is heated, as small bubbles appear on its surface, bearing witness to a high essential oil content. Conversely, an essential oil of poor quality often comes from mixing with other oils, such as sesame oil, or even when the wood is buried in the ground in an attempt to speed up the degradation process and rapidly produce a blackened wood that some sellers lacking scruples pass off as agarwood (Barden *et al.* 2000). According to Jensen and Meilby

(2010), *mai dii* is "good wood" and *mai khilai* (*denhal oudh* in Arabic) is wood of very poor quality. There is also *mai phaktoo*, from raw material, which gives the poorest quality essential oil, which includes *mai khaww*, white wood. Indeed, white wood, the wood of *Aquilaria* spp. trees prior to infection, is still distilled because the essential oil extracted from is also fragrant. On the other hand, the perfume extracted from white wood is less intense, so considered of poorer quality.

Figure 4 : The trunks of *Aquilaria* spp. trees in a plantation in Laos, drilled with holes to facilitate infestation by chemicals.
This practice alters the quality of the essential oil, which is considered to be one reason for the decrease of essential oil business.

The quality of agarwood and the essential oils depends on how the agarwood was produced. Indeed, *Aquilaria* spp. wood can blacken through natural phenomena or be induced by human techniques that are sometimes highly intrusive (Figure 4). In that

case, i.e. when humans voluntarily wound the tree, by piercing it or inserting nails down the trunk, the resulting agarwood is of lesser quality, or even of poor quality (Blanchette *et al.* 2015; Chowdhury *et al.* 2016). It is in seeing this that some authors set in place tree contamination kits that resembled natural infestation (Blanchette *et al.* 2015). Some authors have carried out inoculations of different strains of fungi, such as the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* (Cui *et al.* 2013), the pathogen *Rigidoporus vinctus* (Chen *et al.* 2018), or combinations of fungi (Turjaman *et al.* 2016) to induce agarwood on *Aquilaria* spp. Some studies and field observations have shown that the mediation of a boring insect in agarwood production would seem to result in the best agarwood, without proving that the wounds caused by the insect also enabled the arrival of the different microorganisms involved in the induction and maturation of agarwood.

PROSPECTS FOR DEVELOPMENT OF AGARWOOD PRODUCTION: PLANTING *AQUILARIA* IN FRENCH GUIANA

It is in this context of facilitating international trade that some farmers in French Guiana contacted researchers from CIRAD, the French Center for International Cooperation in Agricultural Research for Development, which works for sustainable development in tropical and Mediterranean regions, with a view to exploit certain species of *Aquilaria* in the tropical zone of South America. The relocating of certain species of *Aquilaria* spp. outside Southeast Asia can be a controversial subject. Indeed, it has often been said that importing alien wood species into an exogenous zone can lead to colonization by invasive alien species detrimental to the new territory. These claims neglect two aspects: the first is the interest of preserving the

species, classed by CITES as at severe risk of extinction in its natural range; the second is the contribution of scientific research helping to answer all the questions making it possible to set up a stable and ethical project. In addition, as already highlighted by Guilioni, in 1991, perfume, aromatic and medicinal plants have a socio-economic interest in several regions of France, including overseas France. Indeed, it is known that the tropical ecology of the latter regions enable the cultivation of certain plants, such as vanilla, in the French West Indies and on the island of Reunion, or of Sandalwood in New Caledonia. The author of this article also reveals the interest for agricultural development and diversification of growing perfume, aromatic and medicinal plants in France. In French Guiana, Rosewood (*Aniba parviflora* (Meisn.) Mez) is one example of such plants, and especially aromatic creepers of interest for perfumery (Amusant *et al.* 2015). Thus, the Aquil@Guyane project was launched in French Guiana by some researchers from CIRAD (Zaremski *et al.* 2017 and 2018). After some very encouraging initial results for the prospects of growing *Aquilaria* spp. crops in French Guiana, it is currently under way to try and develop ways of optimizing high-quality agarwood production in farming.

To do this, several issues are to be realized in the project Aquil@Guyane (Zaremski 2018). Firstly, genetic control of plant species is a priority, to be able to initiate the creation of new cultivars. At present, and despite studies aimed at accurately determining species, whether morphologically or genetically (López-Sampson and Page 2018a; Feng *et al.* 2019), it remains very difficult to accurately identify *Aquilaria* at the species level. Indeed, hybridizations are very frequent, as well between species of the *Aquilaria* genus. Once genetic control is done, which is one of the priorities of plantations in French Guiana, it will be easier to optimize the management

of these plantations for the exploitation of *Aquilaria* trees. One interest, of the plantations of *Aquilaria* in French Guiana is, among other, to master the production of agarwood without necrosis of standing trees. In fact, the objective is to select individuals of *Aquilaria* with multi-stem trunk (Figure 5) to be able to exploit alternately the different stems without having to cut the whole trees, as is often the case in the plantations in Southeast Asia (Figure 4; Blanchette *et al.* 2015). It is also planned to take advantage of the plasticity of *Aquilaria* to establish plantations in a sunny environment whereas they grow naturally in shaded environment. In addition, gravity seed dispersal and low germination survival rate (López-Sampson 2017), suggest that the genus *Aquilaria* does not seem to be invasive. The aim of the exploitation of *Aquilaria* in French Guiana is also to be able to use endemic fungal strains recognized for their lignivorous capacities (Zaremski *et al.* 2019) in order to optimize the defence reactions of *Aquilaria* trees for a production quality controlled agarwood. Thus, the selection of the targeted geographical area, in French Guiana, and tree species of the genus *Aquilaria* with compatible lignivorous fungi, will tend towards a high-quality agarwood from French Guiana. The farms will aim to better respect the biology of the genus *Aquilaria* and contribute to its *ex situ* conservation, in the fields and in the Biological Resource Center, this genus being fully classified in Appendix II of CITES in danger of extinction (CITES 2004).

Figure 5 : *Aquilaria* spp. at Cacao, in French Guiana.
Some species of *Aquilaria* have a single stem trunk (a) whereas others have multi-stem trunks (b)

CONCLUSION

Agarwood, as the world's most expensive luxury fragrance and essential oil, is highly prized and has a prominent place on the international market. The importance of its trade directly jeopardizes the genus of trees from which agarwood is extracted: *Aquilaria*, is listed as endangered in CITES Appendix II. Indeed, the methods of exploitation in plantations or in natural environment are often very destructive, indiscriminate felling of trees in the hope of finding agarwood, despite the vulnerable nature of the species. Quality concept of agarwood is another problem which concerns both the production of agarwood and agarwood essential oil. Thus, although the experts agree that the best agarwood is often the oldest and whose precursors are natural wounds peculiar to the nature of the undergrowth such as the fall of branches,

the passage of animals, the boring insects, the operators try to produce agarwood in an artificial and sometimes harmful way, causing the death of the tree or a low quality agarwood. It is with the aim of addressing these issues of agarwood quality, in respect of the biology of the species that the "Aquil@Guyane" project has been launched. This project aims to plant *Aquilaria* trees in French Guiana to exploit them as close as possible to their ecology while ensuring the selection of new varieties and the preservation of this genus. For farmers, the objective is the establishment of a French Guiana production line of high quality agarwood. For French Guiana, the objective is to be positioned on the global international agarwood market and to contribute to the safeguarding of this endanger group of species.

Acknowledgements

This study was undertaken as part of the *Aquilaria* project (Scientific and technical basis for the creation of a supply chain for top-of-the-range *Aquilaria* (agarwood) essential oils and by-products in French Guiana), funded by the European Commission. Regional Development Fund (ERDF) for French Guiana (contract No. FEDER / 2017 / N ° 31).

REFERENCES

Adam AZ, Lee SY, Mohamed R (2017) Pharmacological properties of agarwood tea derived from *Aquilaria* (Thymelaeaceae) leaves: An emerging contemporary herbal drink. *Journal of Herbal Medicine* 10: 37–44, doi: 10.1016/j.hermed.2017.06.002

Amusant N, Digeon A, Descroix L, Bruneau O, Bezard V, Beauchène J (2015) Planting rosewood for sustainable essential oil production: influence of surrounding forest and seed provenance on tree growth and essential oil yields. *Bois & Forêts des Tropiques* 326 (4): 57-65, doi: 10.19182/bft2015.326.a31283

Andary C, Longepierre D, Le Cong K, Hul S, Zaremski A, Michaloud G (2019) Study of a chemotaxonomic marker able to identify the genus *Aquilaria* (Thymelaeaceae). *Bois & Forêts des Tropiques* 341: 29-38. https://doi.org/10.19182/bft2019.341.a31744

Azren PD, Lee SY, Emang D, Mohamed R (2019) History and perspectives of induction technology for agarwood production from cultivated *Aquilaria* in Asia: a review. *Journal of Forestry Research* 30(1): 1–11, doi: 10.1007/s11676-018-0627-4

Banerjee NR, Furnes H, Muehlenbachs K, Staudigel H, Wit M (2006) Preservation of ~3.4–3.5 Ga microbial biomarkers in pillow lavas and hyaloclastites from the Barberton Greenstone Belt, South Africa. *Earth and Planetary Science Letters* 241(3): 707–722, doi: 10.1016/j.epsl.2005.11.011

Barden A, Anak NA, Mulliken T, Song M (2000) Heart of the matter: agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis*. : 60, Url: http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Traf-072.pdf

Bhattacharyya B, Datta A, Baruah HK (1952) On the formation and development of agaru in *Aquilaria agallocha*. *Science and Culture* 18(5): 240–241

Blanchette RA, Jurgens JA, Heuveling van Beek H (2015) Growing *Aquilaria* and production of agarwood in hill agro-ecosystems. In: *Integrated Land Use Management in the Eastern Himalayas*. Eds K. Eckman and L. Ralte. Delhi, India, p. 66-82

Chakrabarty K., Kumar A., Menon V., 1994. Trade in agarwood. *WWF-India, TRAFFIC-India*, New Delhi, India, 59 p

Chen X, Liu Y, Yang Y, Feng J, Liu P, Sui C, Wei J (2018) Trunk surface agarwood-inducing technique with *Rigidoporus vinctus*: An efficient novel method for agarwood production. *PLOS ONE* 13(6): e0198111, doi: 10.1371/journal.pone.0198111

Chen X, Sui C, Liu Y, Yang Y, Liu P, Zhang Z, Wei J (2017) Agarwood Formation Induced by Fermentation Liquid of *Lasiodiplodia theobromae*, the Dominating Fungus in Wounded Wood of *Aquilaria sinensis*. *Current Microbiology* 74(4): 460–468, doi: 10.1007/s00284-016-1193-7

Chowdhury M, Hussain D, Chung SO, Kabir E, Rahman A (2016) Agarwood manufacturing: a multidisciplinary opportunity for economy of Bangladesh. *Agricultural Engineering International*: The CIGR e-journal 18(3):171-178

Chowdhury M, Rahman A, Hussain MD , Kabir E (2017) The economic benefit of agarwood production through aeration method into the *Aquilaria malaccensis* tree in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 42(1): 191-196, doi: 10.3329/bjar.v42i1.31992

Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), 2004. "Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Consideration of proposals for amendment of appendices-I and –II *Aquilaria* spp. and *Gyrinops* spp.". In: *Proceedings of the Thirteen Meeting of the Conference of the Parties*, Bangkok, Thailand, October 2 to 14, 2004

Cui J, Wang C, Guo S, Yang L, Xiao P, Wang M (2013) Evaluation of fungus-induced agilawood from *Aquilaria sinensis* in China. *Symbiosis* 60(1): 37–44, doi: 10.1007/s13199-013-0237-z

El Enshasy HA, Hanapi SZ, Malek RA, Abdelgalil SA, Leng OM (2019) Endophytic Fungi: The desired biostimulants for essential oil production. In: *Advances in Endophytic Fungal Research*: *Present Status and Future Challenges*, Eds Singh B. P. Cham, Switzerland, p. 211-232

Eurlings MCM, Gravendeel B (2005) TrnL-trnF sequence data imply paraphyly of *Aquilaria* and *Gyrinops* (Thymelaeaceae) and provide new perspectives for agarwood identification. *Plant Systematics and Evolution* 254(1): 1–12, doi: 10.1007/s00606-005-0312-x

Feng T, Li Q, Wang Y, Qiu S, He M, Zhang W, Dong J, Zhu S (2019) Phylogenetic analysis of *Aquilaria* Lam. (Thymelaeaceae) based on DNA barcoding. *Holzforschung* 73(6): 517–523, doi: 10.1515/hf-2018-0127

Ghozland F, Fernandez X (2010) L'herbier parfumé : histoires humaines des plantes à parfum. Ed. *Plume de carotte*, Toulouse, France, 219 p

Gianno R (1986) The exploitation of resinous products in a lowland Malayan forest. *Wallaceana*: *Working Group on* Tropical Ecology *of the* International *Association of Ecology* (INTECOL) 43: 3-6

Guilioni L (1991) Les plantes à parfum, aromatiques et médicinales en France : situation et perspectives. Essai de synthèse bibliographique. Ed. ENSAM, Montpellier, France, 17 p

Jensen A (2009) Valuation of non-timber forest products value chains. *Forest Policy and Economics* 11(1): 34–41, doi: 10.1016/j.forpol.2008.08.002

Jensen A, Meilby H (2008) Does commercialization of a non-timber forest product reduce ecological impact? A case study of the Critically Endangered *Aquilaria crassna* in Lao PDR. *Oryx* 42(02), doi: 10.1017/S0030605308007825

Jensen A, Meilby H (2010) Returns from Harvesting a Commercial Non-timber Forest Product and Particular Characteristics of Harvesters and Their Strategies: *Aquilaria crassna* and Agarwood in Lao PDR1. *Economic Botany* 64(1): 34–45, doi: 10.1007/s12231-010-9108-1

Kalita J, Bhattacharyya PR, Boruah HPD, Unni BG, Lekhak H, Nath SC (2015) Association of *Zeuzera conferta* Walker on agarwood formation in *Aquilaria malaccensis* Lamk. *Asian J. Plant Sci. Res.:* 5: 4–9

Karlinasari L, Indahsuary N, Kusumo H, Santoso E, Turjaman M, Nandika D (2015) Sonic and ultrasonic waves in agarwood trees (*Aquilaria microcarpa*) inoculated with *Fusarium solani*. *Journal of Tropical Forest Science*: 27(3):351-356

Lee SY, Mohamed R (2016a) The origin and domestication of *Aquilaria*, an important agarwood-producing genus. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. *Tropical Forestry Springer*, Singapore, pp 1–20, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_1

Lee SY, Mohamed R (2016b) Rediscovery of *Aquilaria rostrata*(Thymelaeaceae), a species thought to be extinct, and notes on *Aquilaria* conservation in Peninsular Malaysia. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 61(1): 13–19, doi: 10.3767/000651916X691196

Lee SY, Mohamed R, Faridah-Hanum I, Lamasudin DU (2018) Utilization of the internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence to trace the geographical sources of *Aquilaria malaccensis* Lam. populations. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 16(02): 103–111, doi: 10.1017/S1479262117000016

Lee SY, Faridah-Hanum I, Mohamed R (2013) Vegetative description of three *Aquilaria* (Thymelaeceae) saplings in Malaysia. *Pertanika Journals of Tropical Agricultural Science* 36 (Special): 287-294

Lee SY, Weber J, Mohamed R (2011) Genetic variation and molecular authentication of selected *Aquilaria* species from natural populations in Malaysia using RAPD and SCAR markers. *Asian Journal of Plant Sciences* 10(3): 202-211

Leti M, Hul S, Fouché JG, Cheng SK, David B (2013) Flore photographique du Cambodge. *Privat,* Toulouse, France, 589 p

Liu YY, Wei JH, Gao ZH, Zhang Z, Lyu JC (2017) A review of quality assessment and grading for agarwood. *Chinese Herbal Medicines* 9(1): 22–30, doi: 10.1016/S1674-6384(17)60072-8

Liu J, Wu J, Zhao YX, Deng YY, Mei WL, Dai HF (2008) A new cytotoxic 2-(2-phenylethyl) chromone from Chinese eaglewood. *Chinese Chemical Letters* 19(8): 934–936, doi: 10.1016/j.cclet.2008.05.034

López-Sampson A (2017) Growth physiology and productivity of cultivated *Aquilaria crassna* Pierre *ex* Lecomte (Thymelaeaceae) in tropical Australia and its reproduction biology. *College of Science and Engineering*, James Cook University, Australia, 138 p

López-Sampson A, Page T (2018a) History of Use and Trade of Agarwood. *Economic Botany* 72(1): 107–129, doi: 10.1007/s12231-018-9408-4

López-Sampson A, Page T (2018b) Elliptical Fourier Descriptors of Leaf Outlines: A Tool to Discriminate Among *Aquilaria* Species (Thymelaeaceae). *Silvae Genetica* 67(1): 89–92, doi: 10.2478/sg-2018-0012

Mabberley DJ (2008) Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classifications, and uses, 3rd Ed. *Cambridge University Press*, Cambridge, England. XVIII-1021 p

Mei WL, Liu J, Li XN, Dai HF (2010) Study on the chemical constituents from Chinese eaglewood in Hainan. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 18: 573-576

Meyer S, Reeb C, Bosdeveix R (2008) Botanique. Biologie et physiologie végétales. 2e édition. *Collection Sciences fondamentales*, Maloine, Paris, France, 490 p

Mitra J, Gogoi P (2001) Fungi associated with the diseased wood (agarwood/agaru) of *Aquilaria agallocha* Roxb. grown in Assam. In Proceedings of Seminar on Scope and Dimension of Agar Plantation in NE Region of New Delhi, India, eds Ahmed M., Gogoi P., Ahmed G. U., editors. (Hojai: AATMA): 61–69

Mohamed R, Jong PL, Zali MS (2010) Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Diversity* 43: 67-74

Mohamed R, Jong PL, Nurul Irdayu I (2014) Succession patterns of fungi associated to wound-induced agarwood in wild *Aquilaria malaccensis* revealed from quantitative PCR assay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(9): 2427–2436, doi: 10.1007/s11274-014-1668-2

Monggoot S, Popluechai S, Gentekaki E, Pripdeevech P (2017) Fungal endophytes: an alternative source for production of volatile compounds from agarwood oil of *Aquilaria subintegra*. *Microbial Ecology* 74(1): 54–61, doi: 10.1007/s00248-016-0908-4

Naef R (2011) The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review. *Flavour and Fragrance Journal* 26(2): 73–87, doi: 10.1002/ffj.2034

Nakanishi T, Yamagata E, Yoneda K, Nagashima T, Kawasaki I, Yoshida T, Mori H, Miura I (1984) Three fragrant sesquiterpenes of agarwood. *Phytochemistry* 23(9): 2066–2067, doi: 10.1016/S0031-9422(00)84975-4

Naziz PS, Das R, Sen S (2019) The scent of stress: evidence from the unique fragrance of agarwood. *Frontiers in Plant Science* 10:840, doi: 10.3389/fpls.2019.00840

Ng LT, Chang YS, Kadir AA (1997) A review on agar (gaharu) producing *Aquilaria* species. *Journal of Tropical Forest Products* 2(2): 272-285

Nurdiyana ABS (2008) Comparison of gaharu *(Aquilaria malaccensis)* essential oil composition between each country. *Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering*, University Malaysia Pahang, 24 p

Page T, Awarau W (2012) Performance of agarwood *(Aquilaria crassna)* seedling transplants improved by shade and fertiliser. *Forest Ecology and Management* 265: 258–269, doi: 10.1016/j.foreco.2011.10.041

Rajoo KS, Abdu A, Abdul-Hamid H, Karam DS, Shamshuddin J, Jamaluddin ASB, Zhen WW (2013) Assessment of heavy metals uptake and translocation by *Aquilaria malaccensis* planted in soils containing sewage sludge. *American Journal of Applied Sciences* 10(9): 952-964, doi **:** 10.3844/ajassp.2013.952.964

Sadgopal (1960) Explanatory studies in the development of essential oils and their constituents in aromatic plants. Part 1: *Oil of Agarwood*. SPC 33: 41-46

Sen S, Dehingia M, Talukdar NC, Khan M (2017) Chemometric analysis reveals links in the formation of fragrant bio-molecules during agarwood *(Aquilaria malaccensis)* and fungal interactions. *Scientific Reports* 7(1): Article number: 44406, doi: 10.1038/srep44406

Soehartono T, Mardiastuti A (1997) The current trade in Gaharu in West Kalimantan. *Biodiversitas Indonesia* 1: 1-10

Soehartono T, Newton AC (2000) Conservation and sustainable use of tropical trees in the genus *Aquilaria* I. Status and distribution in Indonesia. *Biological Conservation* 96(1): 83–94, doi: 10.1016/S0006-3207(00)00055-0

Soehartono T, C. Newton A (2001) Conservation and sustainable use of tropical trees in the genus *Aquilaria* II. The impact of gaharu harvesting in Indonesia. *Biological Conservation* 97(1): 29–41, doi: 10.1016/S0006-3207(00)00089-6

Soehartono T, Newton AC (2001) Reproductive ecology of *Aquilaria* spp. in Indonesia. *Forest Ecology and Management* 152(1–3): 59–71, doi: 10.1016/S0378-1127(00)00610-1

Subasinghe SMCUP, Hettiarachchi DS (2013) Agarwood resin production and resin quality of *Gyrinops walla* Gaertn. *International Journal of Agricultural Sciences* 3(1): 357-362

Tajuddin SN, Aizal CM, Yusoff MM (2016) Resolution of complex sesquiterpene hydrocarbons in *Aquilaria malaccensis* volatile oils using gas chromatography technique. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. Tropical Forestry. Springer, Singapore, pp 103–124, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_7

Tan CS, Isa NM, Ismail I, Zainal Z (2019) Agarwood induction: current developments and future perspectives. *Frontiers in Plant Science* 10: 122, doi: 10.3389/fpls.2019.00122

The Angiosperm Phylogeny Group, Chase MW, Christenhusz MJ M, Fay MF, Byng JW, Judd WS, *et al.* (2016) — An update of the Angiosperm Phylogeny Group

classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society,* 181(1): 1–20. https://doi.org/10.1111/boj.12385

The Plant List (2013) Version 1.1. Published on the Internet; *http://www.theplantlist.org/ (accessed 1st January 2018)*

Turjaman M, Hidayat A, Santoso E (2016) Development of agarwood induction technology using endophytic fungi. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. Tropical Forestry. Springer, Singapore, pp 57–71, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_4

Watson L, Dallwitz MJ (1992) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version: 11th. February 2019

Yin Y, Jiao L, Dong M, Jiang X, Zhang S (2016) Wood resources, identification, and utilization of agarwood in china. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. Tropical Forestry. Springer, Singapore, pp 21–38, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_2

Zaremski A (2018) Rapport d'exécution Intermédiaire du 1er janvier 2017 au 31 décembre 2018. Le projet Aquil@Guyane: "Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'*Aquilaria* (Agarwood) " haut de gamme et de produits dérivés, en Guyane. CIRAD, Kourou, 24 p

Zaremski C, Ducousso-Détrez A, Amusant N *et al.*(2019) Taxonomic study of French Guiana fungi to identify and isolate pure cultured fungi for oleoresin production in *Aquilaria*: use of sequences from the small ribosomal DNA (r) subunit (SSU) and the two primer pairs SR6/SR10R and SR7/SR1R. *PRO Ligno* 15(3): 3-15

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, *et al.* (2017). NGS analysis of fungal OTUs in *Aquilaria* sp. from French Guyana, Cambodia, Laos and Thailand. In: *Proceedings IRG Annual Meeting* (ISSN 2000-8953). *IRG48 Scientific Conference on Wood Protection*, Ghent, Belgium, June 4-8, 2017: IRG/WP 17-50328

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Andary *et al.* (2018) NGS identification of fungi potentially implicated in the production of agarwood from *Aquilaria* spp. Trees. *PRO Ligno* 14(3): 9-18

Zhang L, Brockelman WY, Allen MA (2008) Matrix analysis to evaluate sustainability: The tropical tree *Aquilaria crassna*, a heavily poached source of agarwood. *Biological Conservation* 141(6): 1676–1686, doi: 10.1016/j.biocon.2008.04.015

Zhou M, Wang H, Suolangjiba, Kou J, Yu B (2008) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology* 117(2): 345–350, doi: 10.1016/j.jep.2008.02.005

CHAPITRE 1 : QUELLES SONT LES COMMUNAUTES FONGIQUES ASSOCIEES AUX *AQUILARIA CRASSNA* DE GUYANE ?

Introduction du Chapitre 1

Objectif

Les recherches menées dans ce chapitre ont pour objectifs de caractériser les communautés fongiques présentes dans le bois des *Aquilaria crassna* de Guyane, des parcelles de Cacao et de Régina. Le but était d'effectuer plusieurs comparaisons : entre les parcelles ; entre les arbres sains et récemment blessés ; entre les échantillons prélevés sur ces arbres, des échantillons d'agarwood du Laos et des échantillons de sol environnant ; comparer ces résultats à ceux fréquemment relatés par la littérature. La problématique était de savoir si nous retrouvions des communautés fongiques habituellement décrites par les auteurs, notamment en Asie du Sud-Est, et / ou si nous mettions en évidence des souches propres aux arbres plantés en Guyane.

Résultats principaux

Notre étude complète l'étude précédente de Zaremski *et al.* (2018), notamment par un échantillonnage beaucoup plus important (80 arbres), sur quatre parcelles situées sur deux zones géographiques différentes, sur des bois à différents états de blessures (non blessés et récemment blessés).

Les résultats de l'étude présentée dans ce chapitre indiquent que certains genres mis en évidence dans les arbres des plantations de Guyane sont couramment décrits dans la littérature, tels que *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Curvularia.* Mais d'autres genres, non relatés dans la littérature, se retrouvent dans les échantillons de Guyane tels que *Periconia* pour le village de Régina, et *Paraphaeosphaeria* pour le village de Cacao.

Conséquences pour l'itinéraire technique

Ces résultats nous ont permis de confirmer la présence de genres de champignons habituellement associés à *Aquilaria* et d'en caractériser d'autres, propres à Cacao ou à Régina. Cela pourra être défini comme un facteur de différenciation entre les huiles essentielles extraites des arbres de Guyane, par rapport à celles extraites d'autres pays, faisant même une différence entre les villages de Cacao et de Régina.

De plus, les principaux phyla mis en évidence sont les Ascomycètes et les Basidiomycètes, plutôt retrouvés dans l'agarwood. Cela nous a orienté, dans l'étude menée dans le chapitre 2 « Peut-on orienter la composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* en fonction du mode d'induction ? » dans le choix des souches de champignons sélectionnées pour l'inoculation qui sont des souches Guyanaises de champignons lignivores Basidiomycètes

CARACTERISATION DES COMMUNAUTES FONGIQUES ASSOCIEES A *AQUILARIA CRASSNA* PIERRE EX LECOMTE EN PLANTATION EN GUYANE FRANÇAISE.

Clara Zaremski[1], Cédric Malandain[2], Olivier Sibourg[2], Benjamin Heuclin[1], Nadine Amusant[3], Marc Ducousso[4]

[1] CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France. AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France. TA A-108 / 1 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France. clara.zaremski@hotmail.fr ; benjamin.heuclin@cirad.fr

[2] ENOVEO, 7 Place Antonin Poncet 69002 Lyon, France. c.malandain@enoveo.com ; o.sibourg@enoveo.com

[3] CIRAD - UMR ECOFOG AgroParisTech, CNRS, INRA, Université des Antilles, Université de Guyane Kourou; BP 701, 97387 Kourou Cedex, French Guiana. nadine.amusant@cirad.fr

[4] CIRAD - UMR 113, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Cirad/IRD/Inra/Agro-M/UM2 Campus international de Baillarguet - TA A - 82 / J, 34398 Montpellier Cedex 5, France. marc.ducousso@cirad.fr

RESUME

Aquilaria est une espèce d'arbre appartenant à la famille des Thymeleaceae. Quand l'arbre est blessé, il peut produire du bois noirci appelé aussi agarwood. Le bois noirci se caractérise par une couleur de bois plus foncée que le bois sain et par un parfum fort qui est très apprécié des parfumeurs et de certaines communautés religieuses orientales. La production de ce bois noirci est présumée dépendre de facteurs environnementaux, parmi lesquels les champignons.

Le but de ce travail est de mettre en place un dispositif expérimental à Régina et à Cacao en Guyane afin d'en caractériser l'organisation des communautés microbiennes, notamment fongiques associées à *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte, pour comprendre les rôles dans la formation de l'agarwood.

Dans cette étude, le séquençage massif à l'aide de terminateurs réversibles (Illlumina), a été utilisé. Parmi les 120 échantillons initiaux dont l'ADN a été extrait, ont été conservés 27 échantillons de bois sains, 29 de bois blessés et 3 échantillons de sols. Ces 59 échantillons ont permis de générer, en moyenne 37.890 séquences par échantillon. Et après traitement informatique, ce sont 921 séquences uniques, réparties dans ces 59 échantillons, qui ont été conservées. Pour les échantillons de bois, des Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTO) majoritaires ont été révélés. Les échantillons de sol ont présenté la même tendance ainsi que plus de diversité d'UTO.

Dans les plantations expérimentales d'*Aquilaria* en Guyane, en vue de produire de l'agarwood de qualité contrôlée, nous avons donc pu déterminer les genres majoritaires présents dans le bois de ces arbres avant et après blessure et les genres majoritaires en fonction des différentes parcelles de Cacao et Régina. Les résultats nous indiquent que certains genres fongiques sont communs entre eux et avec ceux relatés dans la littérature, mais d'autres sont assez caractéristiques d'une zone géographique tel que *Periconia* pour Régina, et *Paraphaeosphaeria* pour Cacao.

MOTS CLES

Agarwood, *Aquilaria*, champignons, communautés microbiennes, Guyane, Illlumina, ITS, séquençage massif, terminateurs réversibles, Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTO).

INTRODUCTION

Le genre *Aquilaria* compte vingt et une espèces d'arbres (Lee *et al.* 2017) et appartient à la famille des *Thymelaeaceae*. Ce genre est endémique d'Asie du Sud-Est et présente une importante valeur culturelle et commerciale grâce à la production d'oléorésine consécutive à des blessures du bois ou à des pathogènes notamment à des champignons lignivores ; ce bois modifié est appelé « agarwood ».

L'agarwood est utilisé depuis des siècles pour la fabrication d'encens et d'huiles essentielles, très prisées et coûteuses. Le prix du kilogramme d'huile essentielle varie principalement entre 5.000 et 10.000 USD, (Barden *et al.* 2000 ; Blanchette *et al.* 2015). Le pourcentage d'arbres produisant de l'agarwood est environ de 10% en milieu naturel (Barden *et al.* 2000) et ce dernier augmente chez les arbres issus de plantations mais présente une production également faible. Par exemple, dans certaines plantations d'Inde, il reste inférieur à 33% (Kalita *et al.* 2015). Cela explique que la ressource s'est progressivement épuisée dans son milieu naturel. De ce fait, la plupart des espèces du genre *Aquilaria* sont classées CITES II (CITES 2004) et figurent sur la liste rouge de cette institution. Ainsi, depuis 2014, des plantations d'*A. crassna* ont été mises en place en Guyane dans le cadre d'un projet de conservation *ex situ* de certaines espèces du genre *Aquilaria* et de leur exploitation dans des conditions respectueuses de leur biologie (Zaremski 2018).

Des études ont permis de caractériser, dans le bois d'*Aquilaria,* des micro-organismes, notamment fongiques, naturellement présents tels que *Aspergillus, Arthrinium, Botryodyplodia, Diplodia, Dokmaia, Fusarium, Penicillium* ou *Trichoderma* (Soehartono et Mardiastuti 1997 ; Mohamed *et al.* 2010 ; Zaremski *et al.* 2018). Certains de ces champignons sont des acteurs de la formation de l'agarwood par leur contribution active à la stimulation des réactions de défense de l'arbre pour sécréter une oléorésine. Le champignon *Lasodiplidia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. semble être constamment présent dans les *Aquilaria* lorsqu'ils forment de l'agarwood, alors que les proportions entre *Fusarium solani* et *Cunninghamella bainieri* Naumov semblent dépendre de l'individu. La formation d'agarwood est initiée par la blessure du tronc et est prolongée par les micro-organismes présents dans le bois (Mohamed *et al.* 2014). Le bois produit alors une oléorésine riche en molécules volatiles et non

volatiles (Naef 2011) qui retardent la progression du champignon et activent également la cicatrisation de l'arbre. Quand le bois d'*Aquilaria* est sain, il a une couleur blanchâtre et est brillant. Lorsque celui-ci est chargé d'oléorésine, il passe d'une couleur beige clair à noir sous l'effet de l'oxydation de l'oléorésine, avec une densité beaucoup plus importante, et devient de plus en plus odorant au cours de l'évolution de ce processus.

Dans une étude préalable, des échantillons d'*Aquilaria* spp. de Guyane, du Cambodge, de Thaïlande et du Laos, ont été prélevés sur les parties aériennes et les racines pour en séquencer les ITS2 fongiques (Zaremski *et al.* 2018). Ainsi 693.961 séquences ont été obtenues et regroupées en 535 Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTO; Ascomycètes 87% ; Basidiomycètes 10,5%). Les communautés fongiques diffèrent significativement entre les parties aériennes et les racines. Des champignons spécifiques d'une aire géographique ont été mis en évidence ainsi que des champignons ubiquistes aux différentes aires. Ces résultats nous ont permis, notamment, de mettre en place notre dispositif en Guyane afin de caractériser l'organisation des communautés microbiennes, notamment fongiques, pour en comprendre les rôles dans la formation de l'agarwood.

Ainsi, nous avons caractérisé les communautés microbiennes associées à *A. crassna* avant toute blessure du tronc et après une blessure récente, laissée aux aléas de l'environnement. Pour cela, du bois a été prélevé sur des arbres sains et sur des arbres blessés six mois auparavant. L'éventuelle origine tellurique de ces communautés a été recherchée par des analyses des communautés microbiennes du sol de la plantation. Grâce à une technologie telle que le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illlumina), des profils des communautés fongiques associées à *A. crassna* ont été obtenus. La technique de séquençage à haut débit choisie (Illumina MiSeq /Double paired end) permet d'amplifier massivement des marqueurs génétiques (ITS) fongiques de grandes tailles (entre 250 et 450 paires de bases) et hypervariables afin de grouper les séquences en fonction de leur homologie entre elles en UTO, qui sont considérées par certains auteurs comme des « espèces moléculaires ». Ces techniques conduisent à l'obtention de centaines de milliers de séquences par *run*, pour obtenir plusieurs milliers de séquences exploitables par modalité, représentant une profondeur de séquençage particulièrement intéressante et riche en information taxonomique.

Cette étude a été réalisée sur des plantations expérimentales d'*A. crassna* en Guyane française à Cacao et à Régina.

MATERIEL ET METHODE

Sites de l'étude

Ces travaux ont été conduits en Guyane, dans le village de Cacao et la commune de Régina (Figure 10, Supplémentaire). Ces villages sont principalement habités par des français d'origine laotienne très impliqués dans des activités agricoles. Le village de Cacao se situe au bord de la rivière la Comté, une rivière du Nord Est de la Guyane. Ses coordonnées sont 4° 33' 52" Nord et 52° 28' 19" Ouest. Cacao se trouve à environ 70 km au Sud-Ouest de Cayenne, le chef-lieu de la Guyane. Le village de Régina se situe au bord du fleuve Approuague, un fleuve du Nord Est de la Guyane. Ses coordonnées sont 4° 18' 42" Nord et 52° 08' 13" Ouest. Régina se trouve à environ 115 km au Sud-Est de Cayenne. Le climat est équatorial humide avec de très faibles variations de température. En revanche, des saisons sèches, d'août à novembre et en février, mars, et des saisons des pluies, d'avril à août et de décembre à février, se distinguent. Le biome est équatorial humide.

Cacao et Régina sont deux villages situés en forêt dense, équatoriale ombrophile et sempervirente, de basse altitude (entre 0 et 100 mètres ; Papy 1979). Hormis les forêts à proximité des cours d'eau, les deux villages présentent une forêt de plaine, en pente douce, bien drainée, sur sol argileux (De Granville 1979). En revanche, leurs caractéristiques géomorphologiques divergent avec un sol sableux et fluviomarin pour Régina et un sol alluvionnaire et granitique pour Cacao (Boye *et al.* 1979). Bien que le nombre de jours de pluie semble équivalent entre Cacao et Régina, sur un an, entre les années 1981 et 2010, Régina fait partie des lieux à la plus forte pluviométrie de Guyane en termes de cumul des précipitations (Météo-France 2016a, b).

Les arbres du genre *Aquilaria,* utilisés dans cette étude, sont issus d'une plantation expérimentale. Les arbres ont été plantés en Janvier 2014.
A Cacao, sur 6 ha, les arbres sont plantés en alternance avec des agrumes, principalement des mandariniers (environ 210 arbres /ha) et un espacement de 4 x 4 m entre chaque arbre. Le sol est recouvert d'une Fabaceae fixatrice d'azote, l'*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. Le champ de Cacao est divisé en trois parcelles sur la base de leur topographie (Figure 11, Supplémentaire). La parcelle A et la parcelle B sont du même côté du champ, en plateau. La parcelle C est plantée sur une partie du champ

en pente. Les arbres de la parcelle A proviennent d'un mélange de graines de provenances multiples (Cambodge, Thailande, Laos). Les arbres des parcelles B et C proviennent de graines originaires du Laos.
Le champ de Régina, de surface plus petite (2 Ha ; environ 500 arbres par Ha), correspond à une seule parcelle, la parcelle P (Figure 12, Supplémentaire). Les arbres d'*Aquilaria* sont plantés en monoculture et le sol était relativement à nu, lors des prélévements.

Dispositif de terrain

Du bois d'*Aquilaria* spp. a été prélevé sur 80 arbres en Mars 2018 : 20 arbres par parcelles (A, B, C et P) et parmi ces 20 arbres par parcelle, 10 étaient sains et 10 avaient déjà été préalablement blessés, 6 mois auparavant. L'échantillonnage s'est réalisé de préférence hors saison des pluies pour un accès plus facile aux parcelles. Sur chaque arbre des trous de 3 mm de diamètre et de 2 à 3 cm de longueur ont été réalisés aseptiquement à l'aide d'une perceuse, au collet de l'arbre, à 1,30m du sol.

La sciure de bois issue de ces trous est alors prélevée aseptiquement à l'aide de pinces stériles. La mèche de la perceuse et les pinces sont désinfectées à l'alcool puis flambées avant chaque prélèvement. Les échantillons ainsi prélevés sont placés dans des tubes Eppendorff stériles de 2 ml placés dans des sachets contenant du Silicagel puis conservés dans le réfrigérateur du laboratoire de Cayenne. Une fois arrivés au laboratoire de Montpellier, les échantillons seront stockés au congélateur à -20°C pour les analyses moléculaires ultérieures.

Descriptif des échantillons

Le Tableau 2 (Supplémentaire) présente la liste des 120 échantillons dont l'ADN a été extrait et qui ont fait l'objet d'un tri pour le séquençage. Dans ce tableau, ces échantillons sont identifiés selon le lieu d'échantillonnage (Cacao, Régina, Laos, labo (laboratoire), la parcelle (A, B, C, P), le type de l'échantillon (bois, carpophore, mycélium, Témoin négatif), l'état sain ou blessé de l'arbre, la masse en grammes, et le nom de l'échantillon selon le positionnement de l'arbre sur la parcelle.

L'étude porte sur 120 échantillons qui feront chacun l'objet d'une extraction de l'ADN total, d'une amplification par PCR des ITS fongiques, du séquençage des produits PCR et de l'analyse des séquences par BlastN, la constitution d'UTOs et leurs assignations à des lignées puis d'une analyse de l'ensemble du jeu de données : 54 échantillons de bois blessés ; 42 échantillons de bois sain ; 8 échantillons de bois noirci (agarwood) provenant du Laos ; 3 échantillons de sol de Cacao ; 9 échantillons de champignons servant de témoin positif ; 4 échantillons « Témoin négatif » d'eau pure.

Extraction et quantification de l'ADN

Une fois prélevés aseptiquement, les 117 échantillons de bois ont servi à l'extraction de l'ADN total suivant le protocole du DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen 2018), après qu'environ 130 mg de poudre de bois ont été broyés finement dans l'azote liquide en utilisant un pilon et un mortier de marbre, afin de rompre mécaniquement les parois végétales. Après avoir contrôlé la pureté et quantifié la concentration d'ADN par dosage fluorimétrique (Quantus®, Qubit®) des analyses moléculaires notamment des amplifications d'ADN par PCR avec des amorces ciblées sur les espaceurs internes transcrits ribosomaux (ITS) et des analyses en F-Risa ont été effectuées pour sélectionner les échantillons à séquencer.

Les trois échantillons de sol ont également été extraits selon le protocole du DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen 2018), hormis le broyage dans l'azote liquide.

Amplification par PCR

La PCR est une réaction enzymatique en chaîne qui permet l'amplification d'une région spécifique de l'ADN. Elle a été décrite initialement par Mullis (1985). La PCR utilise deux oligonucléotides (séquences courtes d'ADN) qui servent d'amorce, une enzyme la Taq DNA polymérase thermostable et des dNTPs (ATP, TTP, GTP, CTP). La PCR est un ensemble de cycles thermiques répété n fois :

- *La dénaturation.* La dénaturation s'effectue par chauffage, au-dessus de la température d'appariement de l'ADN (Tm). Elle provoque la rupture des liaisons non covalentes établies entre les bases (3 liaisons hydrogène entre G-C, 2

entre A-T). On obtient un ADN simple brin orienté 3'-5'.

- *L'hybridation.* La température est abaissée progressivement sous la Tm. Dans ces conditions, les amorces se fixent sur le brin d'ADN matrice dont elles sont complémentaires. Les deux amorces sont placées de part et d'autre de la région à amplifier.
- *L'extension.* Les oligonucléotides servent d'amorce à la Taq Polymérase qui synthétise un brin complémentaire du brin matriciel en intégrant spécifiquement les dNTPs complémentaires correspondants.

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 50 µL contenant 5 µL de matrice ADN (50 ng), 10 µL de tampon 5X Green Go Taq, 4 µl de dnTP, 2 µL de chaque amorce (ITS1 et ITS4 à 10 mM), 0,3 µL de Taq polymerase et de l'eau (26,7 µl) pour compléter jusqu'à 50 µL.

Des témoins sans ADN sont réalisés pour tester la présence d'éventuelles contaminations dans les réactifs et les tampons. Les PCR sont effectuées avec une machine Perkin Elmer Applieds Biosystems : Gen Amp PCR system 9700 ou 2400.

Electrophorèse en gel d'agarose

Un aliquote de 8 µL des produits d'amplification obtenus sont soumis à une migration sur gel d'agarose (Seakem® LE Agarose Larza) à 2,5 %, dans un tampon TAE (tris Acétate EDTA) 1X à 110 volts. Chaque puits est donc chargé de 8 µl de produits de PCR et 3 µl de bleu de charge (6XDNA loading). Le marqueur de taille Quickload® 2-log DNA est utilisé. Le témoin positif utilisé est *Antrodia vaillantii* (DC.) Ryvarden ; le témoin négatif est constitué d'eau ultra pure.

L'intensité de la réaction de PCR, l'intégrité et la taille des fragments d'ADN amplifiés sont évalués après révélation des produits migrés au Bromure d'Ethydium (BET) pendant 15 minutes suivie d'un lavage à l'eau pendant 5 min. et observés sous lumière UV (590 nm).

Après validation de leur qualité sur gel d'agarose, les produits de PCR sont envoyés pour séquençage, au laboratoire ENOVEO de Lyon (www.hydreka.com).

Analyse en F-RISA

L'objectif de l'analyse en F-RISA est de grouper les échantillons pour les sélectionner en vue du séquençage. Cette analyse de l'espaceur ribosomal intergénique fongique a pour but de caractériser les communautés fongiques d'échantillons. L'analyse a été effectuée selon le guide « Agilent DNA 7500 and DNA 1200 » (©Agilent Technologies Inc. 2016). Ainsi, chaque échantillon est représenté par des données qui correspondent à des temps de migration des différents ADN amplifié.

Grâce à ces données, nous avons pu classer les échantillons en 8 groupes pour en sélectionner « 59 ». Ces 8 groupes ont contribué à la sélection des échantillons séquencés, bien que ce soient les métadonnées (types, état, localisation et parcelles) qui ont été décisives dans la sélection des échantillons, présentés dans le Tableau 3 (Supplémentaire) qui présente ces 59 échantillons

Séquençage Illumina

Une fois ces analyses interprétées, le séquençage à haut débit a été effectué. La technologie telle que le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina), a été choisie pour obtenir des profils exhaustifs des communautés fongiques associées à *A. crassna*.

La technique de séquençage haut débit (Illumina MiSeq /Double paired end) a permis d'amplifier massivement des marqueurs génétiques (ITS) fongiques de grandes tailles (entre 250 et 450 paires de bases) et hypervariables afin d'identifier les espèces fongiques présentes.

Toutes les approches d'identification sont tributaires de la présence de la séquence dans les banques de données. C'est-à-dire que le champignon ou des parents proches phylogénétiquement doivent avoir déjà été identifiés.

Le séquençage a été réalisé sur une machine MiSeq (Illumina) en technologie 2x200.

Le protocole de séquençage utilisé dans cette étude suit les recommandations de la société ILLUMINA®. Ainsi sont obtenues des séquences classées en UTO (Unité Taxonomique Opérationnelle).

Les amorces utilisées pour l'amplification des fragments ITS à séquencer sont (Op De Beeck *et al.* 2014) : ITS3F : GCATCGATGAAGAACGCAGC ; ITS4R : TCCTCCGCTTATTGATATGC

Le traitement informatique a été réalisé avec le logiciel R, particulièrement avec le package Dada2 (package version : 1.10.1) en suivant les paramètres informatiques recommandés (Callahan *et al.* 2016) L'annotation taxonomique a été faite en utilisant le classeur bayésien RDP (Wang *et al.* 2007) contre le training set UNITE (Nilsson *et al.* 2019). Les données ainsi générées ont été vérifiées et les indices de diversités calculés grâce au package *Phyloseq* (McMurdie et Holmes 2013).

RESULTATS

Résultats généraux de séquençage

Le séquençage de 56 échantillons de bois et de 3 de sols a permis de générer, en moyenne, 37.890 séquences par échantillon. Il est à noter que 3 échantillons ont généré peu de séquences (ech-39 ; ech-54 ; ech-75). Après traitement informatique, en moyenne 76 % des séquences ont été conservées (Figure 1). Ce qui indique que le séquençage est de bonne qualité.

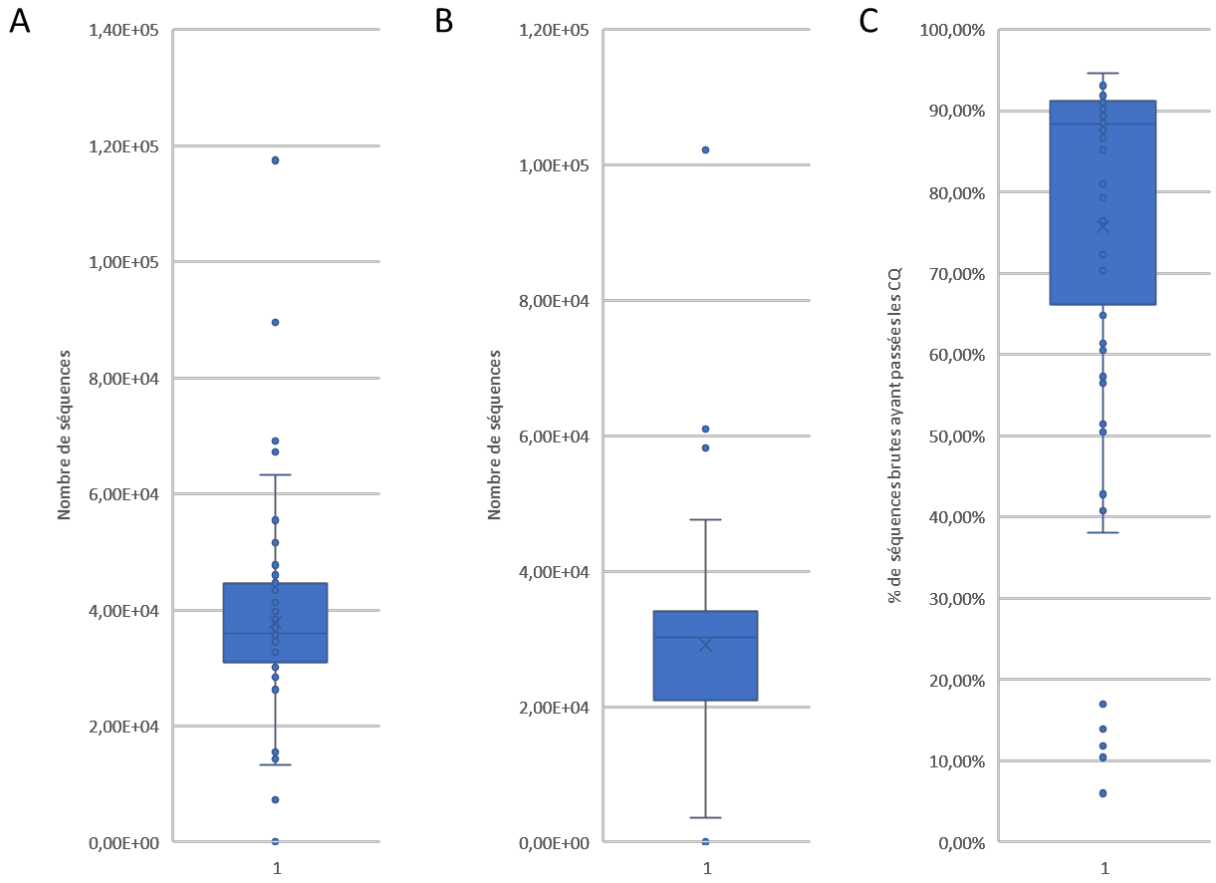

Figure 1 : Nombre de séquences brutes obtenues après séquençage (A) ; nombre de séquences conservées après traitement informatique (B) ; pourcentage de séquences conservées (C).

Ainsi, ce sont 921 séquences uniques, réparties dans 60 échantillons (59 + témoin positif) qui ont été conservées après traitement informatique. Pour vérifier si la diversité des échantillons a bien été décrite, des courbes de raréfactions ont été effectuées (Figure 2). Les courbes, en moitié de parabole, qui s'aplatissent en fonction du nombre de sous échantillons indiquent que la découverte de nouveaux UTO est ralentie. Ainsi, pour les échantillons de bois, on peut dire que les UTO majoritaires ont

été révélés. Les échantillons de sol présentent la même tendance. On remarque également que les échantillons du sol ont plus de diversité d'UTO.

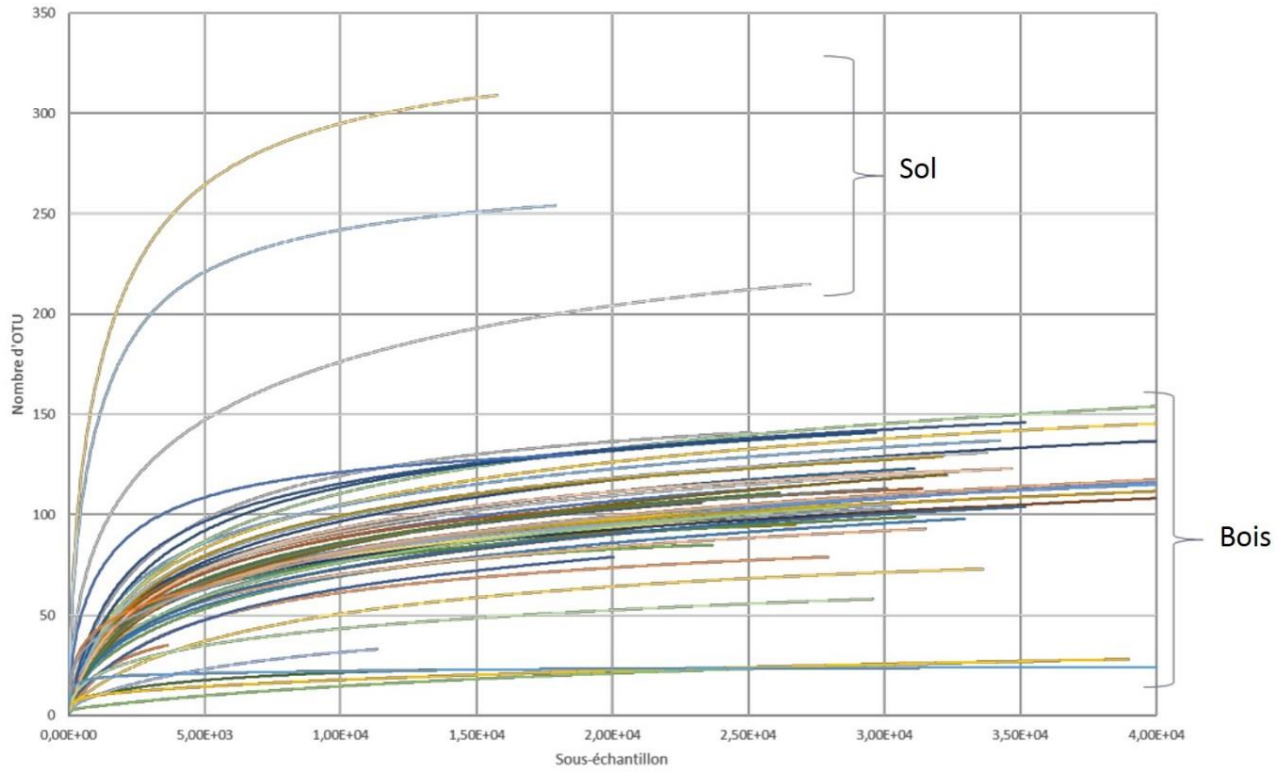

Figure 2 : Courbe de raréfaction des sous échantillons (nombre des sous-échantillons = 50). Les courbes s'aplatissent en fonction du nombre de sous échantillons : la découverte de nouveaux UTO est ralentie. On peut dire que les UTO majoritaires ont été révélés. Les échantillons du sol ont plus de diversité d'UTO.

Résultats généraux après assignation taxonomique

L'assignation taxonomique a été réalisée avec la banque de données UNITE (Tableau 1). Sur 951 séquences, 8 ont été écartées, car elles n'étaient présentes qu'une seule fois, dans un seul échantillon. Il en résulte 913 séquences.

Tableau 1 : Nombre d'UTO par niveau taxonomique.

	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Nombre d'UTO totale	913	913	913	913	913	913
Nombre d'UTO assignées au niveau taxonomique	734	488	422	353	289	181
Nombre d'UTO non assignées	179	425	491	560	624	732

Une analyse de prévalence des phyla met en évidence que les phyla majoritaires sont les Ascomycètes d'abord, suivi par les Basidiomycètes, en second (Figure 3).

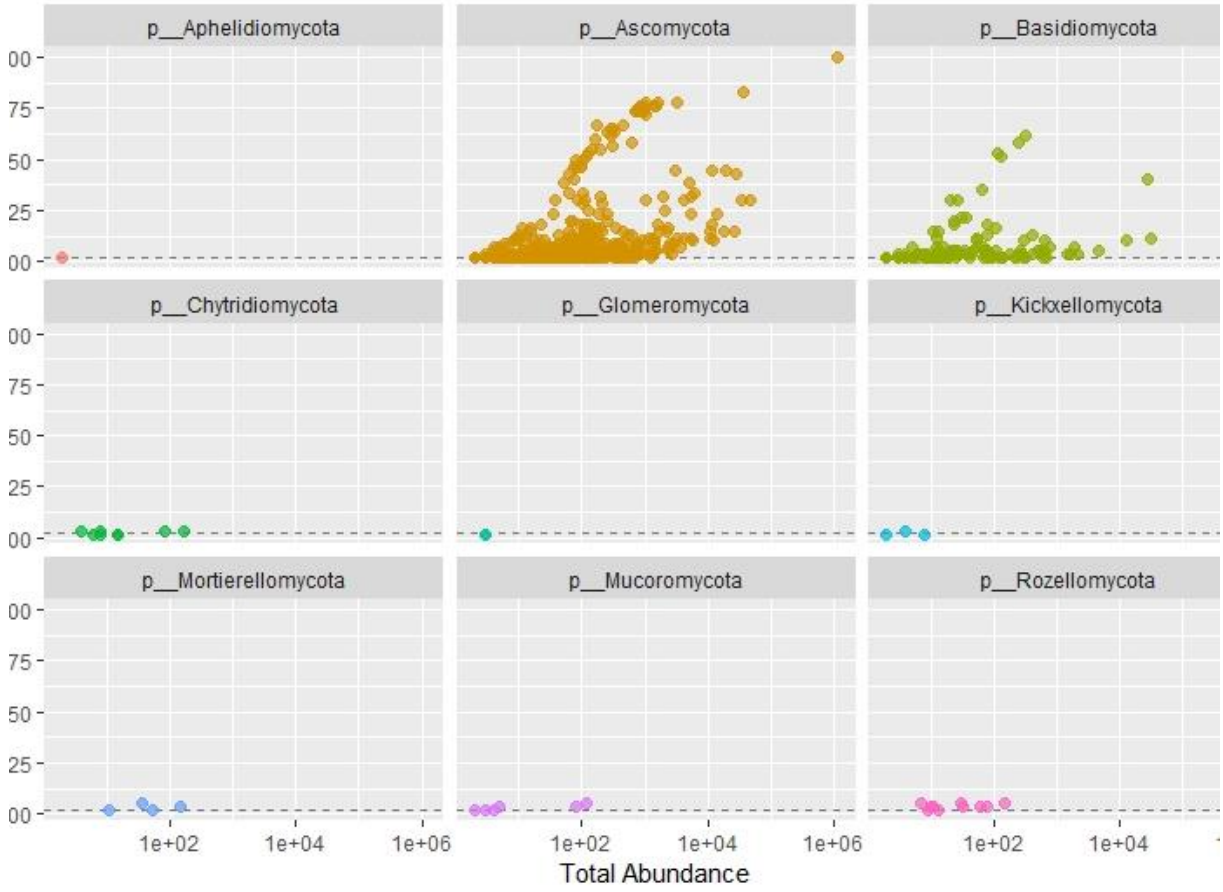

Figure 3 : Prévalence des phyla. Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota et Rozellomycota ont des prévalences supérieures à 5 %. Ascomycota et Basidiomycota sont les principaux phyla. En abscisses, sont présentées les abondances totales, c'est-à-dire les sommes des séquences dans tous les échantillons. En ordonnées, sont présentés les pourcentages des échantillons où la séquence est présente au moins une fois.

Diversité des champignons en fonction des parcelles et de l'état sanitaire du bois

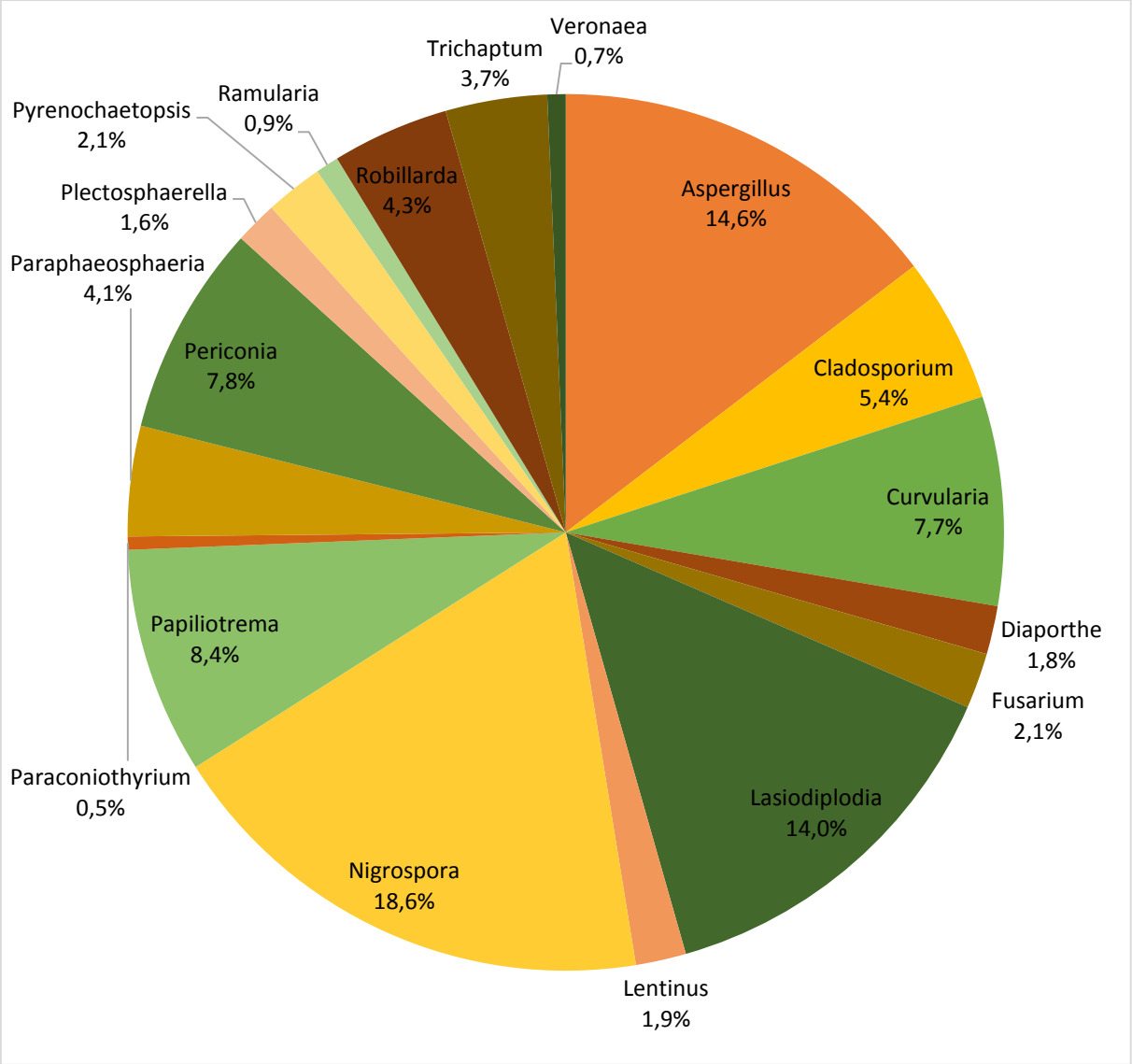

Figure 4 : Distribution des principaux genres de champignons sur l'ensemble des échantillons (Bois de Guyane, Bois du laos, Sol de la parcelle C).

La répartition des principaux genres de champignons obtenus dans l'ensemble des échantillons (bois des arbres de Guyane sains ou blessés, sol de la parcelle C, agar-wood du Laos) est présentée en Figure 4. Il apparaît que les genres les plus représentés dans la totalité de ces échantillons sont *Nigrospora* (18,6 %), *Aspergillus* (14,6 %), *Lasiodiplodia* (14,0 %), *Papiliotrema* (8,4 %), *Periconia* (7,8 %) et *Curvularia* (7,7 %).

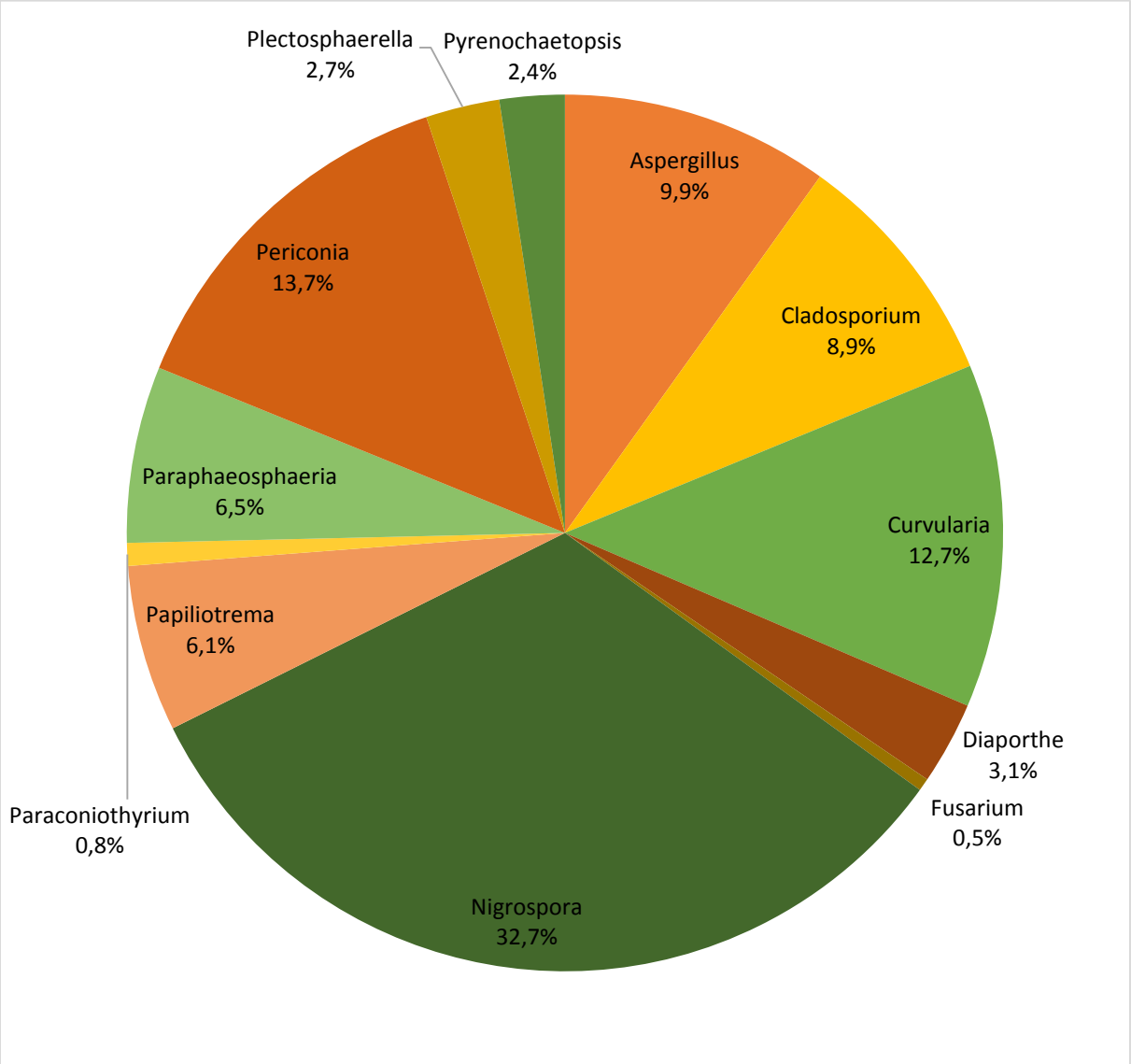

Figure 5 : Distribution des principaux genres de champignons sur les échantillons de bois de Guyane sains et blessés.

La répartition des principaux genres de champignons obtenus dans les échantillons de bois (sains et blessés) des quatre parcelles de Guyane, est présentée en Figure 5. Il apparaît que les genres les plus représentés dans la totalité de ces échantillons sont *Nigrospora* (32,7 %), *Periconia* (13,7 %), *Curvularia* (12,7 %), *Aspergillus* spp. (9,9 %), *Cladosporium* (8,9 %), *Paraphaeosphaeria* (6,5 %) et *Papiliotrema* (6,1 %).

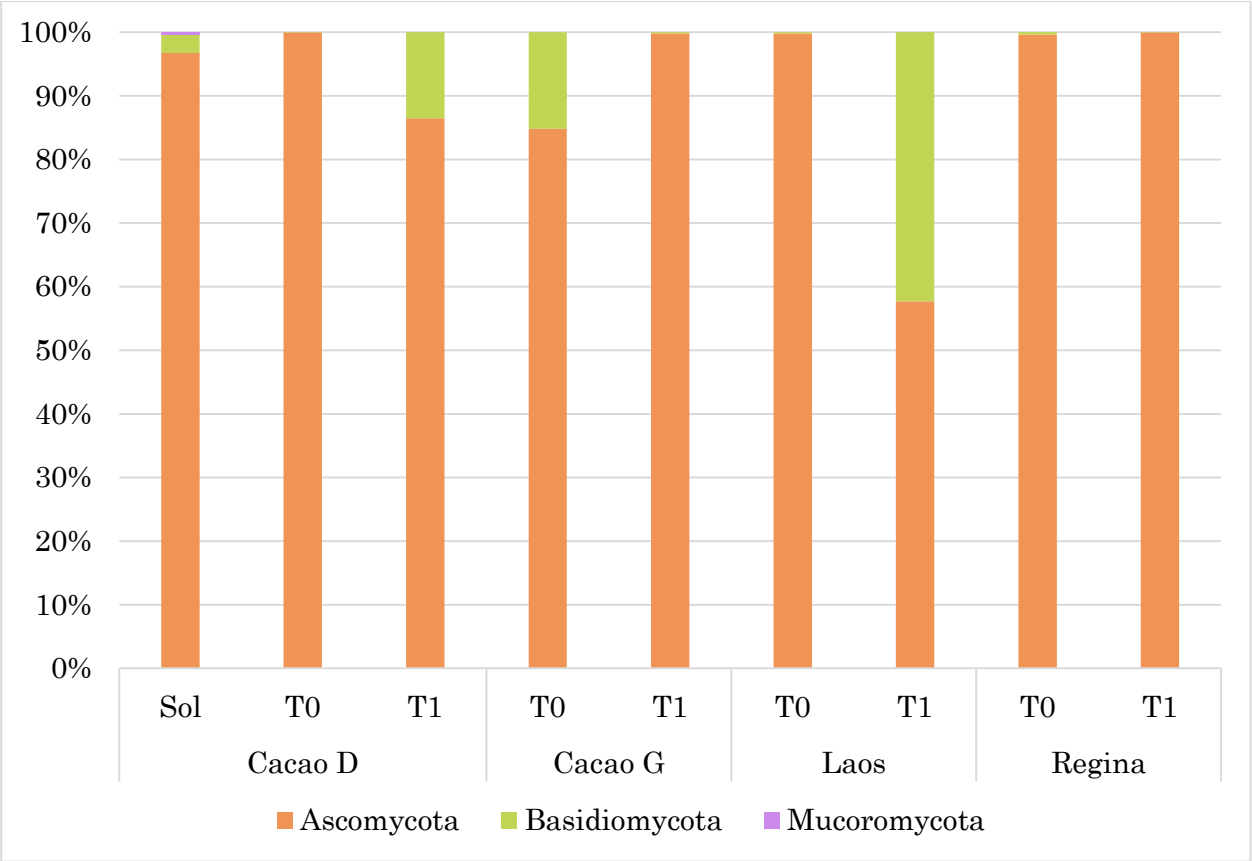

Figure 6 : Distribution des phyla de champignons en fonction de la localité et de l'état des arbres prélevés. Le phyla majoritaire est celui des Ascomycètes. Celui des Basidiomycètes est particulièrement présent dans l'agarwood du Laos.
T0 : bois sain ; T1 : bois blessé

Lorsque l'on caractérise la répartition des principaux phyla dans les échantillons, on remarque que le phyla principal est celui des Ascomycètes (Figures 3 et 6). Les Basidiomycètes sont mis en évidence particulièrement dans l'agarwood du Laos (Laos, T1) et en moindre proportion dans le sol de Cacao D, dans les échantillons de bois d'arbres blessés de Cacao D et dans les échantillons de bois d'arbres sains de Cacao G (Figure 6).

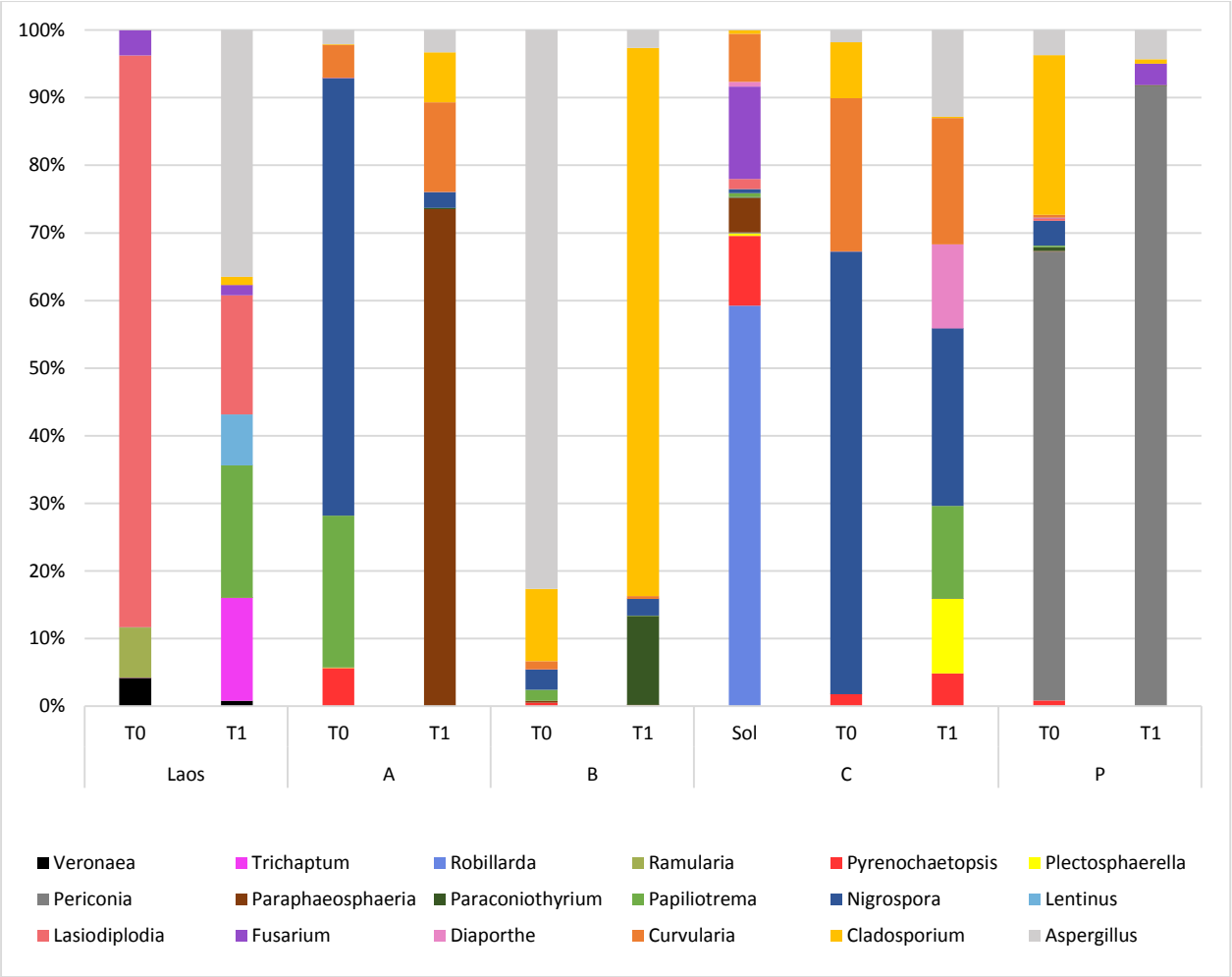

Figure 7 : Distribution des principaux genres de champignons en fonction des différents types d'échantillons et de leurs états.
Bois de Guyane prélevé sur arbre sain (T0), bois de Guyane prélevé sur arbre blessé (T1), sol, pour les quatre parcelles expérimentales de Guyane (A, B, C, P) et bois blanc du Laos (T0, Laos) et agarwood du Laos (T1, Laos).

Les proportions des principaux genres de champignons mis en évidence dans les différents types d'échantillons : échantillon de bois prélevé sur les arbres sains ou blessés de Guyane, échantillon de sol, échantillon de bois blanc et d'agarwood du Laos sont présentées dans la Figure 7. On remarque que tous les profils divergent bien, que le genre *Aspergillus* semble se retrouver dans la plupart des échantillons, excepté l'échantillon de bois blanc du Laos et l'échantillon de sol. Le profil des bois blancs du Laos (Laos, T0) montre une forte proportion du genre *Lasiodiplodia*, genre que l'on retrouve uniquement dans les échantillons du Laos en proportion importante et en très faible proportion dans les autres échantillons. Le genre de champignon *Veronaea,* en plus faibles proportions est également l'apanage des échantillons du Laos. Dans cette modalité de bois blanc du Laos, on retrouve également un autre genre absent des autres modalités : *Ramularia*. L'agarwood du Laos (Laos, T1) est caractérisé par la présence du genre *Lentinus* et par plusieurs genres en proportions assez similaires.

Le profil du bois issu d'arbres blessés de la parcelle C (T1, C) indique le même genre de profil que Laos, T1, qui ne révèle pas vraiment de genre majoritaire. Le profil des échantillons de sol de la parcelle C présente un genre majoritaire, *Robillarda*, qui n'est retrouvé dans aucune autre modalité. Il est également caractérisé par la présence de *Fusarium*, que l'on retrouve dans les échantillons du Laos et dans les échantillons de bois issus d'arbres blessés de la parcelle P, ainsi que de *Pyrenochaetopsis*, que l'on retrouve également, en très faible proportion, dans tous les échantillons en dehors du bois blanc du Laos. L'échantillon de sol a également en commun, avec les autres échantillons de la parcelle C, la présence de *Curvularia,* en proportion importante.

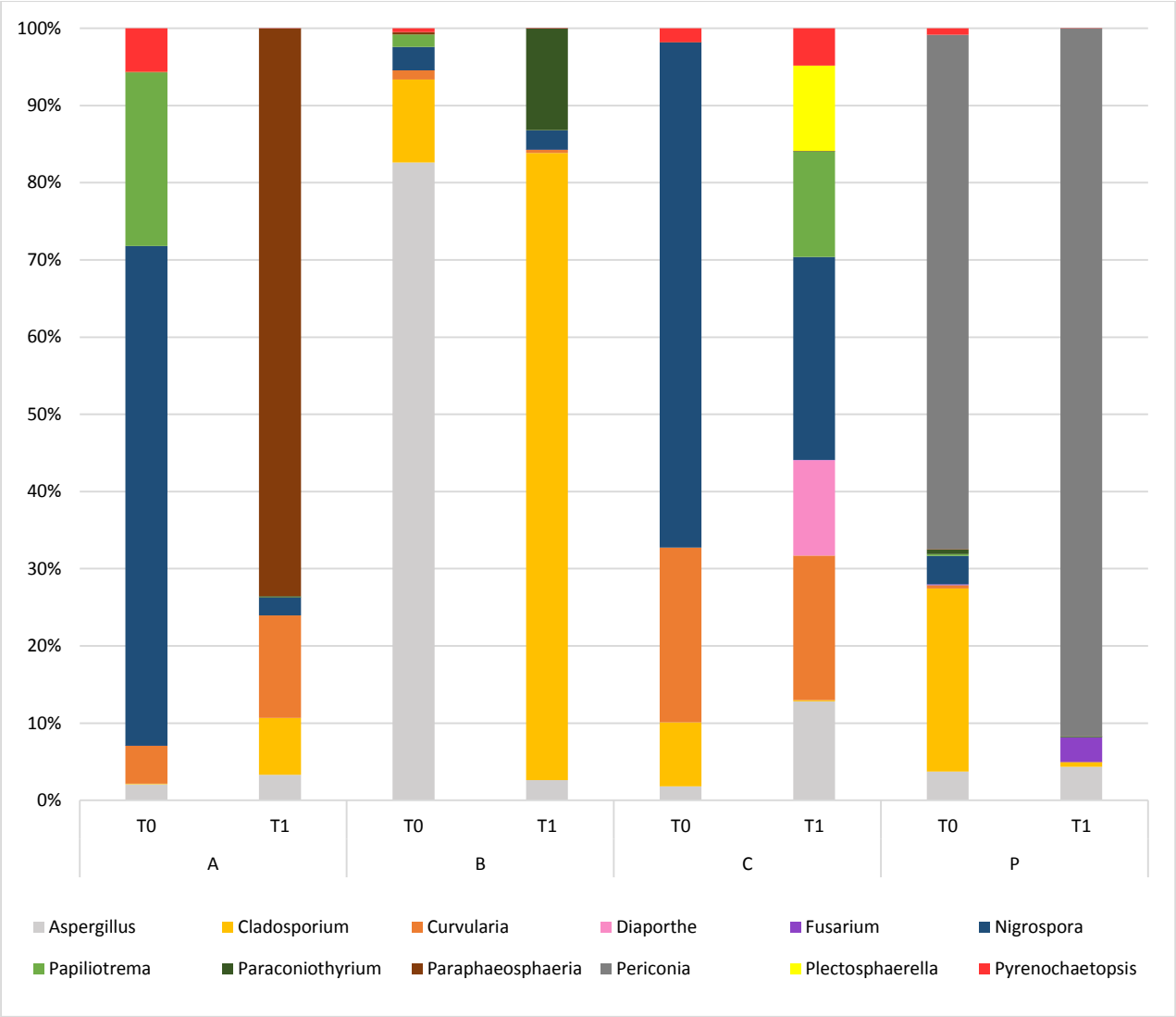

Figure 8 : Distribution des principaux genres de champignons des échantillons de bois des arbres de Guyane en fonction de leur état, sain (T0) ou blessé (T1), pour les quatre parcelles expérimentale expérimentales de Guyane (A, B, C, P)

Les proportions des différents genres de champignons présents dans les échantillons de bois issus des arbres de Guyane, sains (T0) et blessés (T1) pour chaque parcelle de Cacao (A, B et C) et pour la parcelle de Régina (P) sont représentés sur la Figure 8. On remarque qu'il n'y a pas de profil type en termes de genre mais que chacune des modalités semble admettre un genre de champignon majoritaire, à l'exception des échantillons de bois issus des arbres blessés de la parcelle C, qui, de surcroît, sont caractérisés par plusieurs genres qui leur sont propres. La parcelle P présente des caractéristiques uniques, notamment avec la présence majoritaire du genre *Periconia*, que l'on ne retrouve que dans ces échantillons et qui sont majoritaires pour les échantillons issus des arbres sains et des arbres blessés. En effet, sur les autres parcelles, les genres majoritaires diffèrent entre les échantillons issus des arbres sains

et des arbres blessés. Le genre *Nigrospora* est présent dans tous les échantillons, et il est majoritaire dans les échantillons de bois des arbres sains de la parcelle A et C. Le genre *Aspergillus* est présent dans tous les échantillons, et il est majoritaire dans les échantillons de bois des arbres sains de la parcelle B. Le genre *Cladosporium* est également présent dans tous les échantillons, bien que parfois en proportion très faible, mais il est majoritaire dans les échantillons de bois des arbres blessés de la parcelle B. Le genre *Curvullaria* est présent dans tous les échantillons (blessés et sains), mais il n'est majoritaire dans aucun des échantillons. En revanche, le genre *Curvullaria* est présent en proportions remarquables dans les échantillons des parcelles A et C, alors qu'il ne l'est qu'en proportions infimes dans les échantillons des parcelles B et P. Sur la figure 8, les genres *Diaporthe* et *Plectosphaerella* ne sont mis en évidence que pour les échantillons issus d'arbres blessés de la parcelle C. De même, le genre *Fusarium* n'est mis en évidence que pour les échantillons issus d'arbres blessés de la parcelle P, en proportion faible. *Paraconiothyrium* n'est remarquable que dans les échantillons de bois issus d'arbres blessés de la parcelle B. *Paraphaeosphaeria* ne l'est que dans les échantillons issus d'arbres blessés de la parcelle A. Les genres *Papiliotrema et Pyrenochaetopsis* sont présents dans tous les échantillons, le plus souvent en proportion infime hormis pour les échantillons issus de bois sains de la parcelle A et les échantillons issus de bois blessé de la parcelle C. Ainsi, on remarque que les profils des parcelles A et C admettent certaines similitudes alors que les profils de la parcelle B lui sont caractéristiques.

Des tests du Chi2 d'indépendance ont été effectués sur les couples de variables « Genre & Parcelle » et « Genre & Etat (sains ou blessés) ». Les résultats nous amènent à rejeter l'hypothèse d'indépendance pour ces deux couples avec un risque de 1%. Cela montre que certains genres de champignons sont prédominants dans certaines parcelles et certaines parcelles sont l'apanage de certains genres de champignons. Il en va de même pour l'état (sain ou blessé) des arbres. Cela confirme les résultats présentés ci-dessus en référence à la Figure 8.

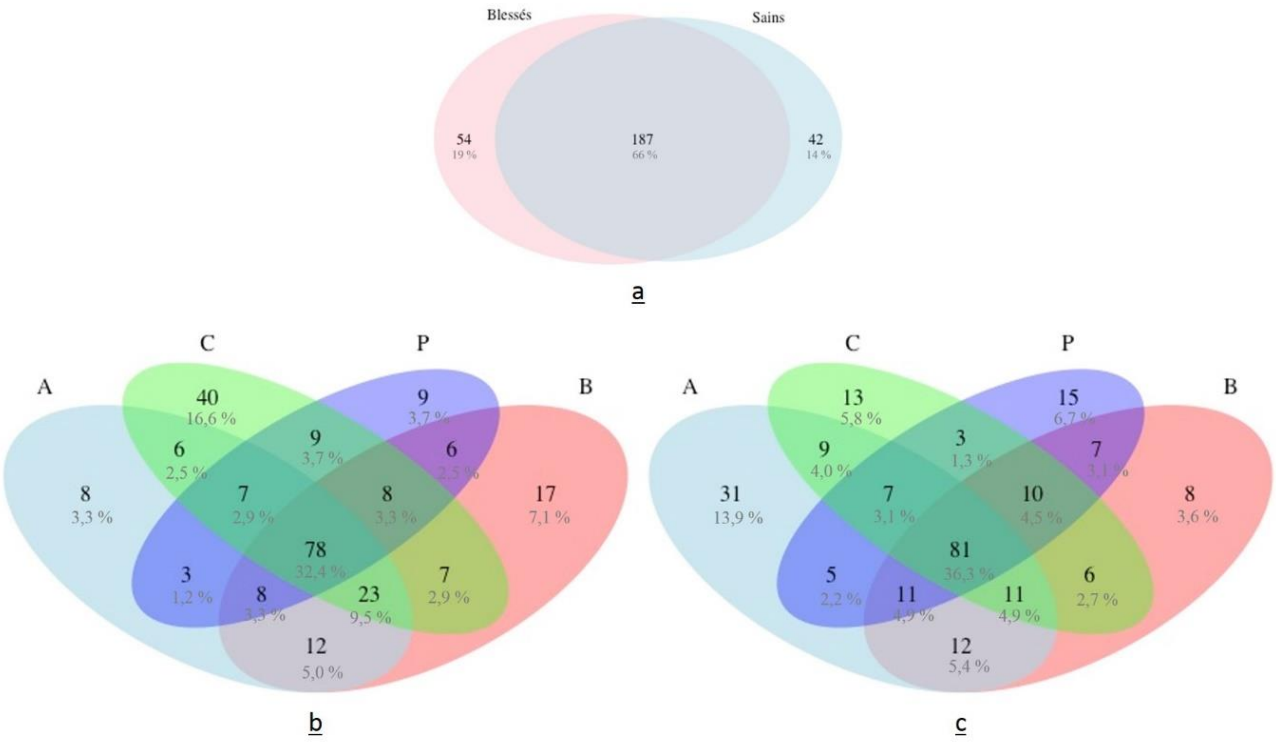

Figure 9 : Diagrammes de Venn des distributions d'UTO fongiques totales, présentes dans les échantillons de bois de Guyane.
a, l'ensemble des échantillons issus des arbres sains et ceux issus des arbres blessés ;
b, les différentes parcelles pour les échantillons de bois issus des arbres blessés ;
c, les différentes parcelles pour les échantillons de bois issus des arbres sains.

Les représentations sous forme de diagrammes de Venn mettent en évidence 66 % d'UTO communes entre les communautés fongiques des échantillons de bois issus des arbres sains de Guyane et ceux issus des arbres blessés de Guyane (Figure 9a).

Concernant les échantillons de bois issus d'arbres sains en fonction des parcelles, on remarque que 36,4 % des UTO sont communes à toutes les parcelles. On remarque, également, que 13,9 % des UTO ne se retrouvent que dans les arbres de la parcelle A, contre 6,7 % pour la parcelle P, 5,8 % pour la parcelle C et 3,6 % pour la parcelle B. 30 % des UTO se retrouve donc sur seulement une parcelle (Figure 9c).

Pour les échantillons de bois issus d'arbres blessés en fonction des parcelles, on a un schéma similaire, avec 32,4 % des UTO communes aux quatre parcelles mais aussi avec 9,5 % des UTO communes aux trois parcelles de Cacao (contre 4,9 % pour les échantillons issus d'arbres sains). 30,7 % des UTO ne se retrouve que dans les échantillons d'une seule parcelle dont 3,3 % pour la parcelle A, 7,1 % pour la parcelle B, 16,6% pour la parcelle C et 3,7 % pour la parcelle P.

DISCUSSION

Le séquençage général met en évidence que la majorité des phyla représentés dans les échantillons de cette étude sont des Ascomycètes et, en second, des Basidiomycètes. Les Ascomycètes ont déjà été mis en évidence dans les études de diversité des micro-organismes présents chez *Aquilaria* dans l'induction de l'agarwood (Chhipa et Kaushik 2017 ; Premalatha et Kalra 2013). Mais plus rares sont les études faisant état des Basidiomycètes (Zaremski *et al.* 2018). Ces auteurs ont montré des différences dans les communautés fongiques entre les parties aériennes et souterraines de l'arbre et que, parmi les séquences regroupées en 535 UTO, 87 % étaient assignées à des ascomycètes et 10,5 % à des basidiomycètes.

Dans notre étude, on remarque que les Basidiomycètes se retrouvent plus particulièrement dans l'agarwood du Laos et, en plus faibles proportions, dans certains échantillons issus du bois des arbres de Guyane et dans les échantillons de sol (Figure 6).

L'analyse des UTO met en évidence que les genres majoritaires retrouvés dans l'ensemble des échantillons sont *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Lasiodiplodia*, *Papiliotrema*, *Periconia* et *Curvularia.* Et les genres de champignons *Cladosporium* et *Paraphaeosphaeria* ne sont mis en évidence que dans les échantillons issus de bois, sains ou blessés de Guyane. Bien que les genres *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Lasiodiplodia, Cladosporium* et *Curvularia* semblent être présents dans les *Aquilaria* producteurs d'agarwood en Inde (Chhipa et Kaushik 2017), en Chine (Gong et Guo 2008), en Malaisie (Mohamed *et al.* 2014) et en Indonésie (Turjaman *et al.* 2016), d'autres genres semblent propres à notre étude dont les *Papiliotrema*, *Periconia* et *Paraphaeosphaeria.*

Ce qui est remarquable, également, c'est que certains de ces genres sont pathogènes tels que *Lasiodiplodia* ou *Nigrospora* et d'autres sont endophytes, tels que *Nigrospora* et *Papiliotrema.* Ainsi, certaines études ont été menées en Asie pour inoculer des *Aquilaria* avec des champignons pathogènes (Chen *et al.* 2017) et d'autres avec des champignons endophytes (Monggoot *et al.* 2017, Turjaman *et al.* 2016). Le genre *Lasiodiplodia,* qui est un phytopathogène potentiel, est utilisé, souvent en mélange avec *Fusarium*, pathogène également, pour induire la formation d'agarwood dans le bois d'*Aquilaria* (Chen *et al.* 2017).

Dans notre étude, le genre *Lasiodiplodia* est caractéristique des échantillons du Laos, dans lesquels on retrouve, également, le genre *Fusarium* ; ce genre est également retrouvé en proportion remarquable dans le sol (Leplat 2012).

Grace à la Figure 8 et aux diagrammes de Venn, des différences entre parcelles et entre bois sains et blessés sont présentées (Figure 9). En effet, bien que 66 % des UTO soient communes aux échantillons de bois issus des arbres sains et blessés et que 36,3 % et 32,4 % des UTO soient communes respectivement, aux arbres sains et blessés, de toutes les parcelles, les proportions de certains genres de champignons en fonction des modalités présentent des différences entre elles.

La parcelle P, seule parcelle de Régina, est caractérisée par la présence de *Periconia*, genre non relaté dans la littérature, et particulièrement présent dans les arbres blessés, associé à *Fusarium*, alors que les arbres sains, où *Periconia* est également majoritaire, est associé à *Cladosporium* et Nigrospora.

Les parcelles de Cacao sont assez différenciées entre elles, surtout la parcelle B dont les échantillons de bois issus des arbres sains ont majoritairement révélé le genre *Aspergillus* et en moindre proportion *Cladosporium*, à l'inverse des échantillons issus des arbres blessés qui ont majoritairement révélé *Cladosporium* et en moindre proportion *Paraconiothyrium*, genre propre à cette modalité et que l'on ne retrouve pas non plus dans le sol ni dans les échantillons du Laos.

Les parcelles A et C de Cacao présentent des profils plus proches, avec notamment, la présence de *Nigrospora* en genre majoritaire pour les échantillons issus de bois sain, de *Curvularia*, de *Pyrenochaetopsis* et d'*Aspergillus*. Ces échantillons se différencient, malgré tout, par une proportion importante de *Papiliotrema* pour la parcelle A et de *Cladosporium* pour la parcelle C. Et les diagrammes de Venn (Figure 9c) indiquent que ces parcelles (A et C), pour les échantillons de bois issus des arbres sains, n'ont que 4% d'UTO communes.

Sur ces mêmes parcelles, A et C de Cacao, les profils des proportions d'abondance de genres sont singuliers pour chacune des parcelles. En effet, pour la parcelle A, le genre majoritaire est *Paraphaeosphaeria*, qui n'est retrouvé qu'en très faible proportion dans les autres échantillonnages de bois, mais que l'on retrouve aussi dans le sol.

En revanche les échantillons issus de bois blessés de la parcelle C ne montrent pas un profil faisant état d'un genre majoritaire, mais de plusieurs genres présents en

proportions remarquables : *Aspergillus* et *Nigrospora*, présents dans tous les échantillons de bois ; *Pyrenochaetopsis,* présent dans les échantillons de bois sains des différentes parcelles et dans le sol ; *Curvularia*, genre commun avec les échantillons de bois sains et blessés des parcelles A et C et présent dans le sol ; *Papiliotrema*, retrouvés également dans les échantillons d'arbres sains des parcelles A et B ; *Diaporthe* et *Plectosphaerella*, caractéristiques de la modalité bois blessé de la parcelle C.

Ainsi, l'analyse des échantillons issus de bois présente des différences prononcées entre Régina et Cacao, avec la dominance du genre *Periconia* à Régina. On rappelle que la conduite des cultures des arbres *Aquilaria* n'est pas la même sur les deux secteurs : différence de savoir-faire entre les agriculteurs, plantation en alternance avec des agrumes à Cacao, présence d'*Arachis pintoi* en couverture du sol à Cacao. Il est à noter que ce genre, *Periconia,* n'est pas non plus relaté dans la littérature.

Les sols de Régina sont sableux et fluviomarins (Boye *et al.* 1979) et Régina est particulièrement soumise aux précipitations (Météo-France 2016a, b).
Cacao, en revanche est sur un sol granitique et alluvionnaire (Boye *et al.* 1979).
Les parcelles A et B sont en plateau alors que la parcelle « C » est en pente. De plus les arbres de la parcelle A proviennent d'un mélange de graines de provenances diverses d'Asie du Sud-Est alors que ceux des parcelles B et C proviennent de graines en provenance du Laos. Il est donc compliqué, à Cacao, de mettre en évidence une souche de champignon majoritaire. Ces champignons se retrouvent, pour la plupart, dans les études sur les *Aquilaria* d'Asie du Sud Est (Chhipa et Kaushik 2017 ; Gong et Guo 2008 ; Mohamed *et al.* 2014 ; Turjaman *et al.* 2016).

Notre étude, qui complète notre étude précédente, Zaremski *et al.* (2018), a permis de mettre en évidence que beaucoup des souches fongiques que nous avons retrouvées dans les échantillons de Guyane sont aussi des souches que l'on retrouve dans les échantillons du Laos ou qui sont relatées dans la littérature. Cependant, certaines souches fongiques font exception, telles que *Periconia,* caractéristique de Régina, et *Paraphaeosphaeria*, plutôt caractéristique de Cacao. Cela pourra être défini comme un facteur de différenciation entre les huiles essentielles extraites des arbres de Guyane, par rapport à celles extraites d'autres pays, faisant même une différence entre les villages de Cacao et de Régina. Car, même si la blessure est à l'origine de l'agarwood, ce sont les cortèges de micro-organimses qui prolongent sa formation et qui le caractérise (Mohamed *et al.* 2014)

CONCLUSION

Plusieurs études ont été menées en Asie pour caractériser les micro-organismes, notamment fongiques, associés au genre d'arbres *Aquilaria*, dans la production d'agarwood. Certains genres sont particulièrement relatés tels que *Lasiodiplodia* et *Fusarium*. Au sein du projet Aquil@Guyane, qui développe des plantations expérimentales d'*Aquilaria* en Guyane, en vue de produire de l'agarwood de qualité contrôlée, nous avons déterminé les genres majoritaires présents dans le bois des arbres des plantations, avant et après blessure. Nous les avons également comparés aux souches fongiques relatées dans la littérature et avec des échantillons de bois du Laos et des échantillons de sol. Les résultats nous indiquent que certains genres sont communs entre eux et avec la littérature mais d'autres sont assez caractéristiques d'une zone géographique tel que *Periconia* pour Régina, et *Paraphaeosphaeria* pour Cacao. De plus, à Cacao, les arbres blessés sont en interaction avec deux souches principales pour les parcelles A et B, respectivement *Paraphaeosphaeria* et *Cladosporium* alors que les arbres de la parcelle C sont en interaction avec plusieurs genres dont aucun n'est majoritaire. A Régina, le genre *Periconia* est majoritaire dans le bois des arbres sains et dans le bois des arbres blessés.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Projet Aquil@Guyane: Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'« *Aquilaria* (Agarwood) » haut de gamme, et de produits dérivés, en Guyane, co-financé par l'Europe, la Collectivité Territoriale de Guyane et le CIRAD : Fonds de développement régional (FEDER) pour la Guyane française (convention n ° FEDER / 2017 / N ° 31).

Nous tenons à remercier tout particulièrement les agriculteurs Messieurs Ya Hu, Didier Tcha et Pierre Tcha pour leur investissement dans la mise en place et le suivi des parcelles expérimentales et pour leur disponibilité sans faille lorsqu'il s'est agi de nous assister lors des prélèvements en champs.

Nous remercions très chaleureusement nos collègues Dr. Alba Zaremski, Dr. Jacques Beauchêne et Arnaud Jahn-Oyak pour leur participation à différentes étapes de cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

©Agilent Technologies, Inc., 2016. Agilent DNA 7500 and DNA 12000. *Kit Guide. Agilent Technologies*. 24 p

Barden A, Anak NA, Mulliken T, Song M (2000) Heart of the matter: agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis*. Traffic network report, *TRAFFIC International*, Cambridge, 60 p. Url: http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Traf-072.pdf

Blanchette RA, Jurgens JA, Heuveling van Beek H (2015) Growing ***Aquilaria*** and production of agarwood in hill agro-ecosystems. In: *Integrated Land Use Management in the Eastern Himalayas*. Eds K. Eckman and L. Ralte. Delhi, India, p. 66-82

Boye M, Chardonnaud M, Seurin M (1979) « La Guyane, Planche 5. Géomorphologie. » *Atlas des départements d'Outre-Mer*. Centre d'Etudes de Géographie Tropicale (CNRS). 12

Callahan BJ, Sankaran K, Fukuyama JA, McMurdie PJ, Holmes SP (2016) Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* 5:1492

Chen X, Sui C, Liu Y, Yang Y, Liu P, Zhang Z, Wei J (2017) Agarwood Formation Induced by Fermentation Liquid of *Lasiodiplodia theobromae*, the Dominating Fungus in Wounded Wood of *Aquilaria sinensis*. *Current Microbiology* 74(4): 460–468, doi: 10.1007/s00284-016-1193-7

Chhipa H, Kaushik N (2017) Fungal and Bacterial Diversity Isolated from *Aquilaria malaccensis* Tree and Soil, Induces Agarospirol Formation within 3 Months after Artificial Infection. *Frontiers in Microbiology* 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.01286

Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), 2004. "Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Consideration of proposals for amendment of appendices-I and –II *Aquilaria* spp. and *Gyrinops* spp.". In: *Proceedings of the Thirteen Meeting of the Conference of the Parties*, *Bangkok, Thailand, October 2 to 14, 2004*

De Granville JJ (1979) « La Guyane, Planche 12. Végétation. » *Atlas des départements d'Outre-Mer*. Centre d'Etudes de Géographie Tropicale (CNRS). 12

Gong LJ, Guo SX (2009) Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *Afr J Biotechnol* 8:731-736

Kalita J, Bhattacharyya PR, Boruah HP, Unni BG, Lekhak H, Nath SC (2015) Association of *Zeuzera conferta* Walker on agarwood formation in *Aquilaria malaccensis* Lamk. *Asian J. Plant Sci. Res.:* 5: 4–9

Leplat J (2012) Développement saprotrophe de *Fusarium graminearum* : rôle respectif de différents habitats naturels du champignon dans le processus d'infection du blé en Bourgogne ; recherche d'indicateurs prédictifs du risque de fusariose. *Thèse Université de Bourgogne, Unité Mixte de Recherche 1347 Agroecologie.* 306 p

McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8:e61217

Météo-France (2016a) « Moyenne annuelle des cumuls pluviométriques. » http://pluiesextremes.meteo.fr

Météo-France (2016b) « Moyenne annuelle du nombre de jours avec pluie >= 1 mm. » http://pluiesextremes.meteo.fr

Mohamed R, Jong PL, Zali MS (2010) Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Diversity* 43: 67-74

Mohamed R, Jong PL, Nurul Irdayu I (2014) Succession patterns of fungi associated to wound-induced agarwood in wild *Aquilaria malaccensis* revealed from quantitative PCR assay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(9): 2427–2436, doi: 10.1007/s11274-014-1668-2

Monggoot S, Popluechai S, Gentekaki E, Pripdeevech P (2017) Fungal endophytes: an alternative source for production of volatile compounds from agarwood oil of *Aquilaria subintegra*. *Microbial Ecology* 74(1): 54–61, doi: 10.1007/s00248-016-0908-4

Mullis KB et Faloona FA (1985) Specific synthesis of DNA *in vitro via* a Polymerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-350

Naef R (2011) The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review. *Flavour and Fragrance Journal* 26(2): 73–87, doi: 10.1002/ffj.2034

Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, Kennedy P, Picard K, Glöckner FO, Tedersoo L, Saar I, Kõljalg U, Abarenkov K (2019) The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res* 47:D259–D264

Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert JV (2014) Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE* 9:e97629

Papy G (1979) « La Guyane, Planche 3. Relief. » *Atlas des départements d'Outre-Mer*. Centre d'Etudes de Géographie Tropicale (CNRS). 3

Qiagen (2018) DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook. Qiagen. 24 p

Premalatha K, Kalra A (2013) Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from resinous and healthy wood of *Aquilaria malaccensis*, a red

listed and highly exploited medicinal tree. *Fungal Ecology* 6(3): 205–211, doi: 10.1016/j.funeco.2013.01.005

Soehartono T, Mardiastuti A (1997) The current trade in Gaharu in West Kalimantan. *Biodiversitas Indonesia* 1: 1-10

Turjaman M, Hidayat A, Santoso E (2016) Development of agarwood induction technology using endophytic fungi. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. Tropical Forestry. Springer, Singapore, pp 57–71, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_4

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267

Zaremski A (2018) Rapport d'exécution Intermédiaire du 1er janvier 2017 au 31 décembre 2018. Le projet Aquil@Guyane: "Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'*Aquilaria* (Agarwood) " haut de gamme et de produits dérivés, en Guyane. *Agritrop CIRAD*, Kourou, 24 p.

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Andary *et al.* (2018) NGS identification of fungi potentially implicated in the production of agarwood from *Aquilaria* spp. Trees. *PRO Ligno* 14(3): 9-18

TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES

Tableau 2 : Liste complète des échantillons préparés pour l'extraction d'ADN et l'analyse en F-RISA, identifiés selon le lieu d'échantillonnage (géographique), la parcelle, le type, l'état de l'échantillon, la masse en grammes, et le nom de l'échantillon selon le positionnement de l'arbre sur la parcelle

Référence	*Géogra-phie*	*Par-celle*	*Type*	*Etat*	*Masse (g)*
ACG 3.02	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1034
ACG 6.10	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1455
ACG 3.04	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1158
ACG 3.05	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1115
ACG 2.07	Cacao	A	Bois	Blessé	0,0945
ACG 5.02	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1224
ACG 5.02	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1246
ACG 5.05	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1514
ACG 5.05 Bis	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1251
ACG 5.06	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1465
ACG 2.08	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1410
ACG 3.01	Cacao	A	Bois	Sain	0,1273
ACG 3.03	Cacao	A	Bois	Sain	0,1085
ACG 4.10	Cacao	A	Bois	Sain	0,1828
ACG 4.06	Cacao	A	Bois	Sain	0,1694
ACG 4.08	Cacao	A	Bois	Sain	0,2132
ACG 5.01	Cacao	A	Bois	Sain	0,1106
ACG 5.08	Cacao	A	Bois	Sain	0,1513
ACG 6.03	Cacao	A	Bois	Sain	0,1362
ACG 7.04	Cacao	A	Bois	Sain	0,2096
ACG 7.07	Cacao	A	Bois	Sain	0,1676
ACG 8.03	Cacao	A	Bois	Blessé	0,1005
ACG 8.03 Lyo	Cacao	A	Bois Lyophilisé	Blessé	NC
ACG 18.03	Cacao	B	Bois	Blessé	0,1767
ACG 19.10	Cacao	B	Bois	Blessé	0,1626
ACG 19.11	Cacao	B	Bois	Blessé	0,147
ACG 19.03	Cacao	B	Bois	Blessé	0,1809
ACG 19.03	Cacao	B	Bois	Blessé	0,614
ACG 19.03 Carotte	Cacao	B	Bois (Carotte)	Blessé	0,2397
ACG 19.06	Cacao	B	Bois	Blessé	0,199
ACG 19.06	Cacao	B	Bois	Blessé	0,151
ACG 19.06	Cacao	B	Bois	Blessé	0,1591
ACG 19.08	Cacao	B	Bois	Blessé	0,1466
ACG 21.12	Cacao	B	Bois	Blessé	0,1022
ACG 21.12 Lyo	Cacao	B	Bois Lyophilisé	Blessé	0,0846
ACG 22.06	Cacao	B	Bois	Blessé	0,1341
ACG 22.10	Cacao	B	Bois	Blessé	0,0814
ACG 22.10 Lyo	Cacao	B	Bois Lyophilisé	Blessé	NC
ACG 22.11	Cacao	B	Bois	Sain	0,1031

ACG 22.05	Cacao	B	Bois	Sain	0,0842
ACG 22.07	Cacao	B	Bois	Sain	0,0775
ACG 22.07 Bis	Cacao	B	Bois	Sain	0,8
ACG 22.09	Cacao	B	Bois	Blessé	0,0993
ACG 22.09 Lyo	Cacao	B	Bois Lyophilisé	Blessé	NC
ACG 23.10	Cacao	B	Bois	Sain	0,1717
ACG 23.07	Cacao	B	Bois	Sain	0,0906
ACG 23.08	Cacao	B	Bois	Sain	0,1546
ACG 24.14	Cacao	B	Bois	Sain	0,1614
ACG 25.10	Cacao	B	Bois	Sain	0,1182
ACG 25.04	Cacao	B	Bois	Sain	0,1069
ACG 26.09	Cacao	B	Bois	Sain	0,0976
B test (silicagel fev 2018)	Cacao	B	Bois récolté en Février	Test	NC
Carotte Guyane Février 2018 B6 Test	Cacao	B	Bois (Carotte)	Test	0,15
Carotte Guyane Février 2018 B6 Test	Cacao	B	Bois (Carotte)	Test	NC
ACD 10.01	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1838
ACD 11.03	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1635
ACD 11.04	Cacao	C	Bois	Sain	0,1503
ACD 12.03	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1401
ACD 12.04	Cacao	C	Bois	Sain	0,1223
ACD 14.02	Cacao	C	Bois	Sain	0,1922
ACD 14.04	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1403
ACD 16.01	Cacao	C	Bois	Blessé	0,152
ACD 16.01 Bis	Cacao	C	Bois	Blessé	0,129
ACD 16.02	Cacao	C	Bois	Sain	0,14
ACD 16.03	Cacao	C	Bois	Sain	0,1341
ACD 17.01	Cacao	C	Bois	Sain	0,1407
ACD 17.02	Cacao	C	Bois	Blessé	NC
ACD 20.01	Cacao	C	Bois	Sain	0,1816
ACD 5.01	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1524
ACD 5.01 Lyo	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1238
ACD 6.01	Cacao	C	Bois	Sain	0,1226
ACD 7.02	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1588
ACD 7.02 Lyo	Cacao	C	Bois Lyophilisé	Blessé	NC
ACD 7.03	Cacao	C	Bois	Sain	0,1594
ACD 8.03	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1015
ACD 8.03 Lyo	Cacao	C	Bois Lyophilisé	Blessé	0,0973
ACD 9.01	Cacao	C	Bois	Sain	0,1814
ACD 9.04	Cacao	C	Bois	Blessé	0,1072
C11 : bois noir, pas de silicagel	Cacao	C	Bois	Blessé	NC
Sol ACD 11.01	Cacao	C	Sol	Sol	0,25
Sol ACD 22.04	Cacao	C	Sol	Sol	0,25
Sol ACD 9.03	Cacao	C	Sol	Sol	0,25

Antrodia vaillanti	Labo	Mycelium	Fungus	NC
Antrodia vaillanti	Labo	Mycelium	Fungus	NC
Bois 01	Laos	Bois	Bois	NC
Bois 02	Laos	Bois	Bois	NC
Bois 03	Laos	Bois	Bois	NC
Bois 04	Laos	Bois	Bois	NC
Bois 05	Laos	Bois	Bois	NC
Bois 06	Laos	Bois	Bois	NC
Yahu 9.10.17	Cacao	Carpophore	Fungus	NC
Coriolopsis polyzona	Labo	Mycelium	Fungus	NC
Gloephylum trabeum	Labo	Mycelium	Fungus	NC
Gloephylum trabeum	Labo	Mycelium	Fungus	NC
HE 01	Laos	Bois	Bois	NC
HE 02	Laos	Bois	Bois	NC
Poria Placenta	Labo	Mycélium	Fungus	NC
Tem neg	Labo	Neg Extraction	Neg	NC
Tem neg	Labo	Neg Extraction	Neg	NC
Tem neg	Labo	Neg Extraction	Neg	NC
Tem neg	Labo	Neg Extraction	Neg	NC
Didier Guyane 2017	Regina P	Carpophore	Fungus	NC
P19	Regina P	Bois	Blessé	NC
P101	Regina P	Bois	Sain	0,099
P102	Regina P	Bois	Sain	0,1243
P103	Regina P	Bois	Sain	0,112
P103 Bis	Regina P	Bois	Sain	0,0915
P104	Regina P	Bois	Sain	0,0758
P105	Regina P	Bois	Sain	0,1213
P106	Regina P	Bois	Sain	0,0557
P107	Regina P	Bois	Sain	0,1376
P108	Regina P	Bois	Sain	0,0762
P109	Regina P	Bois	Sain	0,1195
P110	Regina P	Bois	Sain	0,114
P16	Regina P	Bois	Blessé	0,123
P17	Regina P	Bois	Blessé	0,1355
P18	Regina P	Bois	Blessé	0,1174
P20	Regina P	Bois	Blessé	0,1345
P21	Regina P	Bois	Blessé	0,1555
P22	Regina P	Bois	Blessé	0,0893
P23	Regina P	Bois	Blessé	0,1033
P24	Regina P	Bois	Blessé	0,1069
P25	Regina P	Bois	Blessé	NC

NC : non caractérisé

Tableau 3 : Liste des échantillons séquencés identifiés selon le lieu d'échantillonnage (parcelle et localisation), l'état de l'échantillon et son nom en fonction de son positionnement sur la parcelle.

N° échantillon	*Localisation*	*Parcelle*	*Etat*	*Nom échantillon*
ech-15	Cacao_G	A	Sain	ACG 5.08
ech-20	Cacao_G	A	Sain	ACG 3.03
ech-28	Cacao_G	A	Sain	ACG 4.10
ech-30	Cacao_G	A	Blessé	ACG 5.06
ech-35	Cacao_G	A	Blessé	ACG 5.02
ech-71	Cacao_G	A	Sain	ACG 7.07
ech-75	Cacao_G	A	Blessé	ACG 5.05
ech-83	Cacao_G	A	Blessé	ACG 3.02
ech-86	Cacao_G	A	Blessé	ACG 6.10
ech-91	Cacao_G	A	Sain	ACG 3.01
Ech-126	Cacao_G	A	Blessé	ACG 5.05 Bis
ech-11	Cacao_G	B	Blessé	ACG 19.10
ech-19	Cacao_G	B	Sain	ACG 24.14
ech-32	Cacao_G	B	Blessé	ACG 19.06
ech-33	Cacao_G	B	Sain	ACG 25.10
ech-36	Cacao_G	B	Sain	ACG 22.11
ech-39	Cacao_G	B	Blessé	ACG 19.08
ech-50	Cacao_G	B	Blessé	ACG 19.06
ech-54	Cacao_G	B	Sain	ACG 26.09
ech-56	Cacao_G	B	Blessé	ACG 21.12
ech-59	Cacao_G	B	Sain	ACG 22.07
ech-98	Cacao_G	B	Sain	ACG 23.08
ech-101	Cacao_G	B	Blessé	ACG 19.03
ech-117	Cacao_G	B	Blessé	ACG 22.06
ech-7	Cacao_D	C	Blessé	ACD 17.02
ech-13	Cacao_D	C	Blessé	ACD 14.04
ech-16	Cacao_D	C	Blessé	ACD 12.03
ech-26	Cacao_D	C	Blessé	ACD 7.02
ech-27	Cacao_D	C	Blessé	ACD 11.03
ech-29	Cacao_D	C	Blessé	ACD 5.01
ech-34	Cacao_D	C	Sain	ACD 11.04
ech-45	Cacao_D	C	Sain	ACD 9.01
ech-46	Cacao_D	C	Sain	ACD 7.03
ech-60	Cacao_D	C	Sain	ACD 12.04
ech-69	Cacao_D	C	Blessé	ACD 16.01
ech-78	Cacao_D	C	Sain	ACD 17.01
ech-113	Cacao_D	C	Blessé	ACD 8.03
ech-115	Cacao_D	C	Sain	ACD 6.01
Ech-131	Cacao_D	C	Sol	Sol ACD 9.03
Ech-132	Cacao_D	C	Sol	Sol ACD 11.01
Ech-133	Cacao_D	C	Sol	Sol ACD 22.04
Ech-135	Laos	NC	Sain	Bois 02

Ech-136	Laos	NC	Sain	Bois 03
Ech-137	Laos	NC	Sain	Bois 04
Ech-138	Laos	NC	Sain	Bois 05
Ech-140	Laos	NC	Blessé	HE 01
Ech-141	Laos	NC	Blessé	HE 02
ech-12	Regina	P	Blessé	P16
ech-24	Regina	P	Sain	P109
ech-25	Regina	P	Blessé	P17
ech-41	Regina	P	Sain	P107
ech-44	Regina	P	Blessé	P22
ech-49	Regina	P	Blessé	P20
ech-51	Regina	P	Sain	P108
ech-65	Regina	P	Sain	P103
ech-73	Regina	P	Sain	P105
ech-84	Regina	P	Blessé	P18
ech-90	Regina	P	Blessé	P25
ech-110	Regina	P	Sain	P101

NC : non caractérisé

FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Figure 10 : La Guyane se situe en Amérique du Sud, proche de l'équateur. Cacao se trouve en Guyane, au Sud-Ouest de Cayenne, sur la rivière La Comté. Régina se trouve au Sud-Est de Cayenne, au bord du Fleuve Approuague. D'après www.assistancescolaire.com et www.cartes-2-france.com

Figure 11 : Le champ expérimental de Cacao est divisé en trois parcelles.
La parcelle A et la parcelle B sont du même côté du champ, en plateau. La parcelle C est plantée sur une partie du champ en pente. Les arbres de la parcelle A proviennent d'un mélange de graines de provenances multiples. Les arbres des parcelles B et C proviennent de graines originaires du Laos. Les arbres d'*Aquilaria* sont plantés en alternance avec des agrumes, principalement des mandariniers. Les arbres sont plantés selon des carrés de 4 mètres de côté.

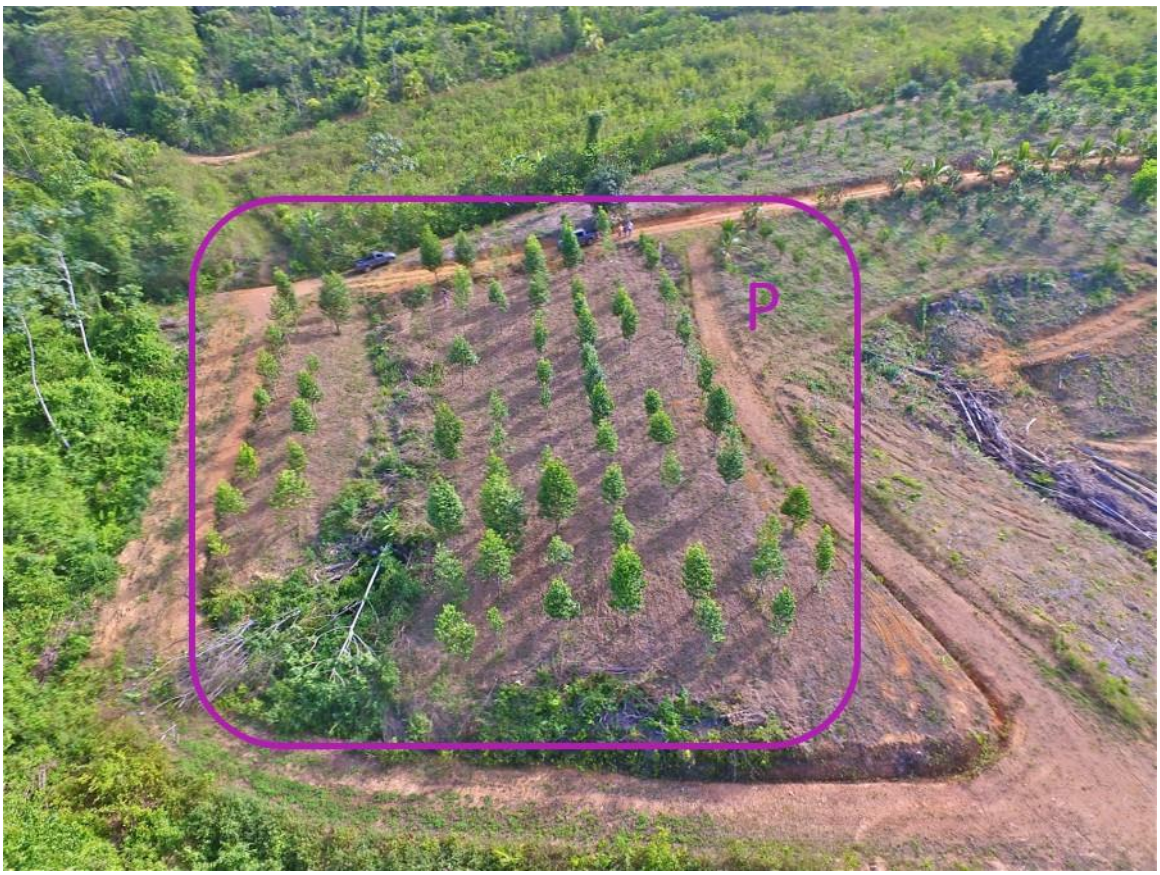

Figure 12 : Le champ expérimental de Régina correspond à la parcelle P.

CHAPITRE 2 : PEUT-ON ORIENTER LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'AGARWOOD D'*AQUILARIA CRASSNA* EN FONCTION DU MODE D'INDUCTION ?

Introduction du Chapitre 2

Objectif

Une des questions principales dans la production d'agarwood est d'essayer de produire de l'agarwood de composition chimique contrôlée, pour obtenir un parfum particulier. C'est cela qui est souvent appelé la « qualité » de l'agarwood. Dans notre étude, qui se porte sur la production d'agarwood en Guyane, par des arbres d'*Aquilaria crassna*, l'objectif était de faire des essais de production d'agarwood de composition chimique se rapprochant le plus possible de notre témoin d'agarwood du Laos de composition chimique considérée de qualité. Pour ce faire, nous avons testé deux méthodes pour induire la production d'agarwood : une méthode d'induction par simple blessure ou ajout de terre dans la blessure pour favoriser la contamination par les micro-organismes environnementaux ; une méthode d'induction contrôlée par des champignons lignivores de Guyane, introduit, par le biais d'éprouvettes de bois, en souche pure, dans les troncs des arbres d'*Aquilaria*.

Résultats principaux

La première étape était de déterminer les champignons qui allaient être inoculés dans les arbres d'*Aquilaria*. L'étude Zaremski *et al.* (2019), qui a permis de caractériser plusieurs champignons lignicoles et lignivores de Guyane et de les cultiver en souches pures, a été déterminante dans le choix des souches de champignons. Ainsi, nous avons sélectionné deux champignons de pourriture cubique, quatre champignons de pourriture fibreuse et le *Gloeophyllum trabeum* dont le comportement peut varier entre ces deux types de dégradation du bois.

Ainsi, nous avons démontré que la méthode d'inoculation en souche pure était beaucoup plus pertinente pour la production d'agarwood par les arbres d'*Aquilaria crassna* en Guyane, que la méthode de contamination par blessure simple ou avec ajout de terre.

Nous avons également mis en évidence que les huiles essentielles extraites de l'agarwood issues des champignons de pourriture fibreuse, plus particulièrement *Ganoderma resinaceum, Pycnoporus sanguineus* et *Gloeophyllum trabeum,* ont une composition chimique qui se rapproche plus de celle de notre témoin d'agarwood du Laos que les autres souches de champignons inoculées. En effet, on retrouve, dans ces échantillons, les composés caractéristiques de l'agarwood, notamment, le phénylbutane, l'eudesmol, l'agarospirol, le jinkoh-eremol, le valenca et le valerianol.

Conséquences pour l'itinéraire technique

Ces résultats ont tout d'abord montré l'efficacité des champignons lignivores de pourriture fibreuse de Guyane, inoculés en souche pure, à produire un agarwood de composition chimique proche de notre agarwood de référence.

Ces analyses biochimiques ont été complétées par des analyses en Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) pour déterminer la pertinence de ces analyses dans la classification des différents échantillons de bois d'*Aquilaria* et des différents agarwood.

Les résultats en SPIR et en chromatographie en phase liquide sont cohérents. Ainsi, la SPIR pourrait être développée comme un outil de contrôle de la composition chimique permettant d'effectuer rapidement un tri, en fonction de la composition chimique du bois et de l'agarwood, directement dans l'atelier avant l'hydrodistillation. Cette perspective est d'autant plus intéressante que les analyses en SPIR sont rapides et peu coûteuses.

COMPOSITION CHIMIQUE DE L'AGARWOOD D'*AQUILARIA CRASSNA* PIERRE EX. LECOMTE DES PLANTATIONS DE GUYANE, EN FONCTION DU MODE D'INDUCTION.

Clara Zaremski[1], Nadine Amusant[2], Marc Ducousso[3], Georges Michaloud[4], Benjamin Heuclin[1], Claude Andary[5], Chantal Menut[6]

[1] CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France. AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France. TA A-108 / 1 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France. clara.zaremski@cirad.fr ou clara.zaremski@hotmail.fr ; benjamin.heuclin@cirad.fr

[2] CIRAD - UMR ECOFOG AgroParisTech, CNRS, INRA, Université des Antilles, Université de Guyane Kourou; BP 701, 97387 Kourou Cedex, French Guiana. nadine.amusant@cirad.fr

[3] CIRAD - UMR 113, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Cirad/IRD/Inra/Agro-M/UM2 Campus international de Baillarguet - TA A - 82 / J, 34398 Montpellier Cedex 5, France. marc.ducousso@cirad.fr

[4] Retired from CNRS, UMR 5120 AMAP - CIRAD, Montpellier, France / 599 rue de Fontcouverte, 34070 Montpellier, France. michaloud@cirad.fr

[5] Retired from Faculty of Pharmacy, University of Montpellier and from CEFE, UMR 5175, CNRS, Montpellier, France / 17 rue des Millepertuis, 34830 Clapiers, France. claude.andary@gmail.com

[6] IBMM - UMR 5247, Université de Montpellier, CNRS, Bâtiment E, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier, France. chantal.menut@univ-montp2.fr

RESUME

L'agarwood, connu également sous le nom d'Oud en parfumerie, est un bois modifié au contact de micro-organismes exhalant un parfum suave et enivrant, rare et précieux. Il tient sa rareté de son existence même, au sein des arbres du genre *Aquilaria*. En effet, l'agarwood est issu d'une interaction entre le bois de ces arbres et des cortèges de micro-organismes qui, après blessure du tronc, induisent une réaction conduisant à la production de composés secondaires qui confèrent à ce bois, après oxydation, sa couleur noire caractéristique. Ces composés sont principalement des chromones et des sesquiterpènes oxygénés tels que l'eudesmol, l'agarospirol, le jinkoheremol et le valerianol. La demande de l'agarwood sur le marché international augmente considérablement depuis une dizaine d'années. Ses dérivés, dont l'huile essentielle qui en est extraite, sont donc coûteux. L'huile essentielle d'agarwood, qui se vend de 5 000 US$ à 10 000 US$ le kg, est la plus chère du marché. Cela explique que ce produit soit convoité par les exploitants qui essayent de pallier sa rareté en mettant en œuvre diverses méthodes d'induction de l'agarwood. Souvent ces méthodes, tel le criblage de trous ou de clous, du tronc des arbres ou l'inoculation de mélanges de produit biologico-chimiques, sont délétères pour les arbres et nuisent à la composition chimique de l'huile essentielle qui en est extraite. C'est pourquoi, un consortium d'agriculteurs de Guyane et de scientifiques et du CIRAD (Centre français de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) développent le projet Aquil@Guyane, qui vise à cultiver des arbres d'*Aquilaria* originaires d'Asie du Sud-Est, en Guyane, dans le but de produire de l'agarwood de composition chimique contrôlée, en respectant la biologie et l'écologie des arbres, tout en participant à la conservation du genre *Aquilaria*, classé en danger d'extinction (en annexe II de la CITES) dans son aire d'origine. C'est ainsi, qu'un essai d'induction biologique a été mis en place. Deux méthodes d'induction ont été expérimentées : une méthode d'induction du bois noir par des micro-organismes environnementaux obtenus à partir de blessures des troncs, contaminées ou non par du sol de la plantation, et une seconde méthode d'induction du bois noir par des souches de champignons cultivées sous forme de souches pures, sélectionnées pour leur caractère lignivore et pour être des champignons communs en Guyane. Pour cette deuxième méthode, les expérimentations ont été conduites spécifiquement avec des champignons de pourritures cubiques et de pourritures fibreuses. Pour comparer ces deux méthodes entre

elles, nous avons étudié : les surfaces de propagations de l'inoculation ; les composés volatils constituant les huiles essentielles extraites du bois noirci ; les rendements en huiles essentielles. Nous avons pu ainsi montrer que la seconde méthode d'induction du bois est une méthode efficace pour produire un agarwood de composition chimique contrôlée avec un rendement qui semble être plus intéressant que le rendement commercial habituel. Il est à noter que les champignons de pourriture fibreuse, et tout particulièrement *Ganoderma resinaceum*, *Gloeophyllum trabeum* et *Pycnoporus sanguineus*, sont les plus efficaces pour l'induction, la qualité de la composition chimique et le rendement en huiles essentielles.

MOTS CLES

Agarwood, *Aquilaria*, bois blanc, bois noir, champignons lignivores, composés volatils, Guyane, hydrodistillation, pourriture fibreuse, pourriture cubique, sesquiterpènes.

INTRODUCTION

L'agarwood, connu également sous le nom d'Oud, est utilisé en parfumerie pour le parfum intense et suave de l'oléorésine qui en est extraite. Ainsi, l'oléorésine issue de ce bois est utilisée dans des parfums aux notes orientales envoûtantes et est l'apanage du luxe en termes de fragrance. Ce luxe vient de la rareté de ce produit, d'autant plus lorsqu'il se veut de haute qualité. En effet, l'agarwood est un bois transformé par l'interaction complexe entre les genres des arbres de la famille des Thymelaeaceae et des cortèges de micro-organismes, notamment fongiques, et, plus particulièrement, des *Ascomycètes*. Le genre *Aquilaria* est le genre d'arbre principalement exploité pour obtenir de l'agarwood. Ce genre compte actuellement vingt et une espèces (Lee *et al.* 2017), mais le bois d'agarwood peut également apparaître chez certaines espèces appartenant aux genres *Gyrinops* et *Gonystylus* (Gratzfeld et Tan 2008)

Le bois sain d'*Aquilaria* est blanc. En interactions complexes avec des micro-organismes, notamment fongiques, l'arbre produit un bois transformé par sa forte teneur en métabolites secondaires produits en réaction au stress biotique (Naziz *et al.* 2019). Ce bois transformé ou agarwood est riche en molécules aromatiques oxydables, à l'origine de sa couleur noire, et présente une forte teneur en oléorésines et huiles essentielles : environ 150 molécules (Naef 2011) comprenant des molécules volatiles hydrodistillables et des molécules non distillables, mais extraites par des solvants polaires (acétone, méthanol, eau ...). Ces extraits ainsi que l'huile hydrodistillable, obtenus à partir de l'agarwood, forment un mélange complexe composé de différents groupes de structures chimiques, essentiellement des sesquiterpènes tels que : Agarospirol, ß-Agarofuran, 10-epi-γ-Eudesmol, Guaiol, Jinkoh-eremol (Deep et Tajuddin 2019 ; Tan *et al.* 2019), ainsi que des chromones tels que : les 2-(2-Phenylethyl)-chromones, les 5,6,7,8-Tetrahydro-2-(2-phenylethyl)-chromones et les diepoxy-tetrahydro-2-(2-phenylethyl)-chromones. Ces deux dernières molécules sont de bons indicateurs pour une identification du bois d'agarwood (Naef 2011). Sous l'effet de l'oxydation, l'agarwood présente une densité plus importante (la densité du bois sain est d'environ 0,4 ; la densité du bois noirci peut atteindre : 1,028 pour de l'agarwood appartenant à des arbres âgés de 75 à 80 ans (Sadgopal 1960) et devient de plus en plus odorant au fil du temps.

Lorsque l'arbre est blessé, il est exposé à l'incursion des micro-organismes environnementaux. D'après plusieurs auteurs (Soehartono et Mardiastuti 1997 ; Mohamed *et al.* 2010 ; Zaremski *et al.* 2018), les genres de champignons qui colonisent *Aquilaria* sont *Aspergillus, Arthrinium, Botryodyplodia, Diplodia, Dokmaia, Fusarium, Penicillium* et *Trichoderma*. D'après Mohamed *et al.* (2014), les communautés fongiques auraient une préférence pour les arbres poussant dans des milieux plus sombres et plus humides, ce qui correspond au tempérament d'*Aquilaria,* espèce de sous-bois.

Le pourcentage d'arbres produisant de l'agarwood est environ de 10% en milieu naturel (Barden *et al.* 2000) et ce dernier augmente peu avec des arbres issus de plantations qui présentent une production également faible. Par exemple, dans certaines plantations d'Inde, il est inférieur à 33 % (Kalita *et al.* 2015). Le fait que le commerce de l'agarwood soit lucratif, avec le prix du kilogramme d'huile essentielle variant principalement entre 5 000 et 10 000 US$, (Barden *et al.* 2000 ; Blanchette *et al.* 2015), explique que la ressource ait été progressivement épuisée dans son milieu naturel. De ce fait, la plupart des espèces du genre *Aquilaria* sont sur la Liste Rouge de la CITES et classées CITES II (CITES 2004). De plus, certaines espèces d'*Aquilaria,* principalement, *A. malaccensis* Benth., *A. crassna* Pierre ex. Lecomte et *A. filaria* (Oken) Merr. (Naziz *et al.* 2019) sont cultivées, notamment en Chine, en Thaïlande, en Inde, en Malaisie et dans d'autres pays d'Asie du Sud-Est. Mais, pour obtenir de l'agarwood, les planteurs procèdent souvent de manière très agressive lors de l'inoculation des micro-organismes dans les arbres. Cette approche, à terme, peut dénaturer l'agarwood et la qualité des huiles essentielles qui en sont extraites, avec pour conséquence extrême la mort prématurée des arbres. Les méthodes agressives les plus citées (Blanchette *et al.* 2015 ; Naziz *et al.* 2019 ; Tan *et al.* 2019) sont les blessures provoquées par des coupures, par le criblage de trous suite à l'introduction de clous tout le long des troncs ; ces derniers peuvent être sujets ou non à l'injection de mélanges de micro-organismes et/ou d'adjuvants chimiques pour accroître le stress de l'arbre. L'agarwood qui en résulte ne répond alors plus aux demandes du marché.

Aussi, pour remédier à ces problèmes, nous avons testé deux nouvelles méthodes d'induction du bois noir chez *A. crassna* présentes en plantation en Guyane. Notre but était d'élaborer des techniques naturelles, facilement répétables par les agriculteurs, respectueuses de l'environnement et adaptées à celui-ci.

Deux techniques novatrices d'inoculation de champignons de Guyane et/ou d'inoculation en souche pure sur éprouvette de bois, ont été expérimentées. La première technique est une induction de contamination par des champignons environnementaux, après une forte entaille de l'écorce mettant à nu le bois. La contamination a été assurée par les champignons environnementaux après application ou non de sol de la plantation. La deuxième technique d'induction de contamination est basée sur l'introduction de champignons sélectionnés, cultivés en souche pure, *via* des éprouvettes de bois. Ainsi, nous avons pu comparer la présence de composés secondaires caractéristiques des bois noircis obtenus par le biais de ces différentes méthodes d'induction, entre eux et par rapport à des échantillons témoin d'agarwood d'Asie du Sud-Est en vue de discuter de leur composition en composés secondaires. Nous avons, également, déterminé le rendement en oléorésine des bois noircis obtenus par ces différents modes d'induction.

MATERIEL ET METHODE

Site de l'étude

Ces travaux ont été conduits en Guyane française, plus particulièrement dans le village de Cacao, de la commune de Roura (Figure 15, Supplémentaire). Cacao est un village principalement habité par des français d'origine laotienne très impliqués dans des activités agricoles. Le village se situe au bord de la rivière la Comté, une rivière du Nord Est de la Guyane. Ses coordonnées sont 4° 34' 17" Nord et 52° 28' 11" Ouest. Cacao se trouve à environ 70 km au Sud-Ouest de Cayenne, chef-lieu de la Guyane. La Guyane est localisée en Amérique du Sud, proche de l'équateur, à envrion 4° de latitude Nord et 53° de longitude Ouest, sur le plateau des Guyanes. La Guyane présente peu de reliefs et l'ensemble de la région est principalement élevée de 100 à 200 mètres d'altitude. Le climat de la Guyane est équatorial humide avec de très faibles variations de température. En revanche, des saisons sèches, d'août à novembre et de février à mars, et des saisons des pluies, d'avril à août et de novembre à février, se distinguent. Le biome est équatorial humide.

Les arbres du genre *Aquilaria* sélectionnés dans cette étude sont issus d'une plantation expérimentale conduite en partenariat avec le CIRAD et un groupement d'agriculteurs. Les arbres ont été plantés en janvier 2014. Nous avons divisé le champ en trois parcelles (Figure 16, Supplémentaire). La parcelle A et la parcelle B sont du même côté du champ, en plateau. La parcelle C est plantée sur une partie du champ en pente. Les arbres de la parcelle A proviennent d'un mélange de graines de diverses provenances. Les arbres des parcelles B et C proviennent de graines originaires du Laos. Pour cette étude, nous avons sélectionné les arbres situés uniquement sur les parcelles B et C. Les *Aquilaria* sont plantés en alternance avec des agrumes, principalement des mandariniers. Les arbres sont plantés avec un espacement de 4 mètres au carré. Le sol est recouvert d'une Fabaceae fixatrice d'azote : *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.

Matériel biologique : sélection des champignons utilisés

L'objectif méthodologique innovant était de choisir des espèces locales qui sont adaptées aux biomes guyanais et de ne pas utiliser d'autres éléments que du matériel

biologique, c'est-à-dire des champignons, et leur support, de l'aubier. De plus, les expérimentations ont été menées dans un but de répétabilité et de transfert de compétences entre les différents acteurs, dans le but d'une production agricole de rente.

Afin de tester la capacité des espèces fongiques à stimuler la production d'agarwood sur des *A. crassna* de plantations établies en Guyane, trois étapes ont été nécessaires pour préparer l'inoculum à introduire dans les arbres. La première étape a été d'identifier et de sélectionner les champignons d'intérêt pour l'étude, parmi les champignons récoltés dans des zones proches des sites d'étude. La deuxième étape a été de produire du mycélium pur à partir de la mise en culture des champignons, appartenant aux Basidiomycètes, sur milieu de culture. La troisième étape a été de procéder au développement du champignon sur des éprouvettes de bois placées dans les boites de Pétri en vue d'inoculer les arbres. Ces éprouvettes ainsi colonisées par du mycélium pur de champignon ont servi à inoculer les arbres pour l'étude.

Etape 1 : Identification et choix des champignons de Guyane pour l'étude

Nous avons réalisé une étude taxonomique basée sur des séquences de la petite sous-unité (SSU) de l'ADN ribosomique (r) en utilisant les deux paires d'amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R, sur 39 fructifications de champignons issues des sites forestiers situés près de Cacao et Régina, deux communes de l'Est de la Guyane proches des sites expérimentaux (Zaremski *et al.* 2019). Les champignons ont été récoltés à l'état frais, en bon état sur du bois mort au sol (25 champignons) et sur des arbres morts sur pied (14 champignons ; Figure 17, Supplémentaire). Parmi les 39 échantillons, les analyses par BlastN ont permis de mettre en évidence des proximités taxonomiques avec les genres *Antrodia, Coriolopsis, Fomitopsis, Ganoderma, Poria, Lentinus, Pycnoporus, Auricularia, Gloeophyllum, Trametes, Fomitopsis* et *Rigidoporus*.

La production de mycélium en culture pure, à partir des fructifications identifiées dans cette étude, a été utilisée pour produire l'inoculum que nous avons testé pour sa capacité à stimuler la production d'oléorésine sur des arbres *Aquilaria crassna* de plantations établies en Guyane française. Parmi les champignons cultivés en souche pure nous avons choisi cinq champignons de pourriture fibreuse (PF) et deux de pourriture cubique (PC) (voir encadré). Ces champignons ont été choisis du fait de leur fréquence élevée dans l'aire naturelle, et donc aisément disponibles, ainsi que pour

leur forte capacité à produire du mycélium en conditions de laboratoire. Toutes les souches sont des souches Guyanaises. Les champignons choisis pour l'étude figurent ci-dessous :

- S'agissant des champignons de pourriture fibreuse : *Coriolopsis polyzona* (Pers.) Ryvarden (CP) ; *Ganoderma resinaceum* Boud. (GR) ; *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill (PS) ; *Rigidoporus vinctus* (Berk.) Ryvarden (RV) ; *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill (GT). Le GT peut se comporter aussi bien comme un champignon de pourriture cubique que comme un champignon de pourriture fibreuse (Zaremski 2005). Si, en biotope continental, il se comporte plutôt en champignon de pourriture cubique, notamment en dégradant les gymnospermes, en biotope tropical humide, il se comporte comme un champignon de pourriture fibreuse.
- S'agissant des champignons de pourriture cubique : *Poria placenta* (Fr.) Cooke (PP) ; *Antrodia vaillantii* (DC.) Ryvarden (AV) ;

Champignons de pourriture fibreuse et cubique, d'après Fougerousse, 1979

Parmi les champignons, ceux qui s'attaquent au bois le font en dégradant soit la lignine, soit la cellulose, soit les deux à la fois, et sont nommés lignivores (qui mangent le bois) ou lignicoles (qui vivent dans le bois) du latin *« lignum »*, le bois. Ces champignons peuvent être spécialisés en étant assujettis soit à des espèces résineuses, soit à des espèces feuillues, voire aux deux à la fois. Ces champignons appartiennent à deux grands groupes, selon leur spécificité à dégrader le bois : un groupe qui engendre une pourriture colorée ou cubique et un autre groupe qui engendre une pourriture blanche ou fibreuse. Les agents de pourritures cubiques sont destructeurs de la cellulose mais peu dommageables pour la lignine, ce qui entraîne une coloration plus foncée du bois. Le processus de dégradation du bois par les pourritures fibreuses est plus complexe car tous les constituants des membranes ligneuses peuvent être détruits. Souvent ce processus de dégradation débute par la dégradation de la lignine et se poursuit par la dégradation de tous les constituants de la paroi dans un ordre variable suivant les champignons.

Etape 2 : Production de mycélium pur des champignons sélectionnés pour nos essais

Les conditions, pour la culture des champignons destinés à l'inoculation, sont les suivantes (Figure 18, Supplémentaire) :

- dimensions des boites de Pétri stériles en plastique : 12,5 x 12,5 x 1,5 cm ;
- dimensions des éprouvettes de bois (aubier de hêtre pour les pourritures fibreuses ou aubier de pin sylvestre pour les pourritures cubiques. Ce choix a été fait en fonction des affinités des types de champignons pour les résineux ou les feuillus) : 7 x 0,7 x 0,7 cm;
- nombre d'éprouvettes par boîte de Pétri préalablement stérilisées à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes : 5 éprouvettes ;
- espacement des éprouvettes de bois en boites de Pétri : de 1 cm à 1,5 cm ;
- milieu de culture : pour 500 mL d'eau distillée : 20g de Malt + 10g d'Agar-Agar (Malt 4% & Agar 2%) ; stériliser par autoclave, 121°C pendant 20 minutes ; après stérilisation, laisser le milieu de culture tiédir ; distribuer dans les boites de Pétri (environ 40 mL de milieu de culture par boîte) ;
- enceinte climatique : obscure, régulée à une température de 22 ± 2°C et à une humidité relative (HR) de 70 ± 5 % ;
- principaux matériels utilisés : autoclaves ; balances ; hotte à flux laminaire horizontal ; eau désionisée.

Nous avons cultivé, en souche pure, sur malt agar, environ 12 boites de Pétri pour chaque champignon, qui ont été utilisées d'une part pour notre expérimentation et d'autre part dans le but de conserver chacune de ces souches pour la mycothèque du laboratoire.

La mise en culture s'est effectuée aseptiquement sous hotte à flux laminaire. Les cultures ont été placées à l'obscurité, en enceinte climatique, pendant une durée d'environ 20 jours. Durant ces 20 jours, nous vérifions l'absence de contamination de la culture et son développement dans la boîte de Pétri. Les boites de Pétri présentant une contamination ou un mauvais développement ont été éliminées.

Etape 3 : Développement du champignon dans les éprouvettes de bois dans les boites de Pétri

Pour le développement du champignon dans le bois, une fois la plage de culture entièrement recouverte par le mycélium de chacune des souches, des éprouvettes de bois stériles (aubier de hêtre pour les pourritures fibreuses ou aubier de pin sylvestre pour les pourritures cubiques) sont introduites aseptiquement dans les boîtes de Pétri, sous hotte à flux laminaire, puis placées à l'obscurité, en enceinte climatique régulée à une température de 22 ± 2°C et à une HR de 70 ± 5 %, pendant une durée de deux mois. Durant ces 2 mois, nous vérifions l'absence de contamination de la culture et le développement du champignon dans le bois. Les boites de Pétri présentant une contamination ou un mauvais développement sont éliminées. Après une période d'incubation de 2 mois, nous pouvons procéder à l'inoculation des arbres en champs.

Matériel végétal : la sélection des arbres de l'étude

Dans cette étude, nous avons sélectionné les arbres destinés à tester sept souches de champignon. Aussi, nous avons sélectionné des arbres considérés comme témoins négatifs du fait qu'ils ont été ensemencés par des éprouvettes de pin sylvestre et de hêtre non inoculés préalablement par des champignons. Cet essai a été réalisé pour mettre en évidence l'importance de l'inoculation par des souches de champignons définies pour obtenir un agarwood de composition chimique contrôlée. Enfin nous avons aussi contaminé des arbres par une éprouvette infestée par le champignon *R. vinctus,* ce dernier constituant un témoin positif. En effet, Chen *et al.* (2018) ont montré qu'il est possible d'obtenir de l'agarwood avec cette espèce de champignon, qu'ils avaient isolée de branches d'*A. crassna* produisant de l'agarwood. Trois arbres sont utilisés pour chacune des modalités (champignons d'essais, témoins positif et négatif) testées : ce qui fait un total de 27 (3 x 9) arbres inoculés lors de cette expérimentation. Les arbres proviennent tous de la parcelle B du champ expérimental de Cacao et présentent la même provenance et le même âge (5 ans).

Inoculation ciblée de souches de champignons dans les arbres en champs

Tableau 1 : Identifications des arbres en fonction des différentes modalités.

Champignon	Arbres
Gloeophyllum trabeum	ACG 19.7
Pycnoporus sanguineus	ACG 20.14
Poria placenta	ACG 21.6
Coriolopsis polyzona	ACG 22.13
Antrodia vaillantii	ACG 23.3
Ganoderma resinaceum	ACG 24.8
Rigidoporus vinctus	ACG 34.11
Témoin négatif "Pin"	ACG 27.1
Témoin négatif "Hêtre"	ACG 29.8
Inoculation après levée de l'écorce et application de sol de la plantation	ACD 5.3 ACD 6.3 ACG 24.5

Les arbres ont été inoculés par les éprouvettes contaminées ou non le 11 septembre 2018 par l'introduction de 10 éprouvettes par arbre. Une première série d'arbre – un arbre par modalité – a été abattu le 10 juin 2019 afin d'analyser la réaction de l'arbre 9 mois après l'inoculation. Dans le Tableau 1, nous désignons, en fonction de chaque condition d'expérimentation, les arbres concernés. En effet, des études précédentes avaient montré que plus la durée est élevée entre la blessure et la récolte d'échantillons et plus il y a de chance d'avoir une formation d'agarwood, 9 mois semblant être la durée expérimentale minimale (Rasool et Mohamed 2016).

Le mode opératoire de l'inoculation est le suivant :

- Retrait de l'écorce, sur un carré de 4 x 4 cm, après désinfection à l'alcool et au feu, à l'aide d'un ciseau à bois, désinfecté également. (Figure 1.a, b)
- Perçage du tronc, après désinfection à l'alcool et au feu du foret de la perceuse, au centre du carré sans écorce à une profondeur suffisante (8 cm min) sans

traverser l'arbre. Pour ce faire nous avons privilégié des arbres de diamètre supérieur à 40 cm. (Figure 1.c)

- Insertion de l'éprouvette (contaminée ou non), à l'aide de 2 pinces préalablement désinfectées, dans le trou fait précédemment, en l'insérant jusqu'au fond. (Figure 1.d, e)
- Fermeture du trou avec quelques mL de résine de goudron de Pin sur la face interne du carré de l'écorce enlevée préalablement. Note : une fois sèche, l'écorce ne tient plus (Figure 1.f).
- Cette manipulation est répétée 10 fois sur un même arbre, en se décalant dans le sens de la hauteur mais aussi dans le sens radial "en colimaçon" (Figure 1.g). L'expérience est faite sur 3 arbres par "champignon" et aussi 3 arbres pour les éprouvettes témoins.

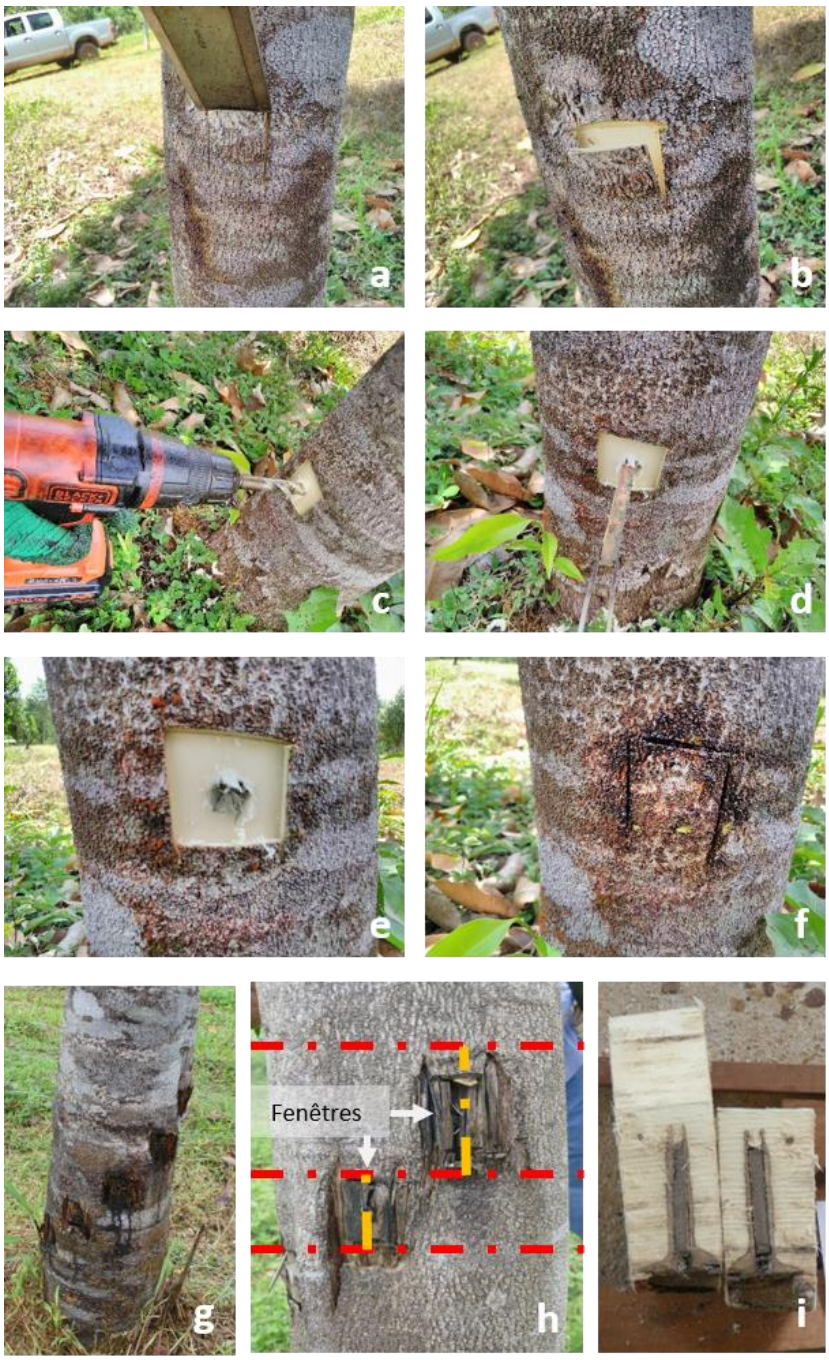

Figure 1 : Protocole d'inoculation par insertion des éprouvettes de bois (a à f), observations et découpe des arbres après 9 mois d'inoculation (g à i).

a et b. Avant d'insérer l'éprouvette, retrait de l'écorce sur une surface suffisante, à l'aide d'un ciseau à bois.

c, d et e. Perçage à 10 mm du tronc sur une profondeur de 8 cm pour permettre l'insertion de l'éprouvette dans la totalité.

f. Rebouchage du trou avec l'écorce retirée précédemment, préalablement enduite de goudron.

g. Après 9 mois d'inoculation, observation des *Aquilaria* sur lesquels ont été insérées des éprouvettes selon la méthode de "colimaçon".

h. Après 9 mois d'inoculation, découpe des troncs pour les observations. 1 : découpe des rondelles autour des « fenêtres » selon les pointillés rouges ; 2 : découpe au milieu de la « fenêtre » selon les pointillés oranges.

i. Photographie de l'échantillon découpé. Sélection des plus réguliers pour l'étude en proche infrarouge.

Inoculations de champignons environnementaux par application de sol ou non sur une blessure de surface sur les arbres en champs

L'objectif de cette approche méthodologique était de comparer deux types de blessures de surface qui permettaient l'infestation par les champignons environnementaux. En ajoutant, sur l'une des blessures, du sol environnemental, nous envisagions une accélération du processus. Pour pouvoir comparer ces types de blessures, nous avons sélectionné des arbres à trois tiges minimum pour que l'une soit blessée sans ajout de sol, une autre soit blessée avec ajout de sol et qu'une troisième fasse office de témoin.

Nous avons sélectionné 25 arbres sur la parcelle C de Cacao, présentant au moins 3 tiges, deux des tiges étant soumises à l'essai et le troisième servant de témoin. La contamination a été assurée cette fois par les champignons environnementaux après ajout de sol ou non afin d'appliquer un stress (micro-organismes environnementaux) et de suivre la réponse des arbres conduisant à la production d'oléorésine. Pour cela, sur chaque arbre, nous avons, sur deux des tiges, appliqué un stress (blessure au ciseau à bois sur 25 cm de long et 5 cm de large, profondeur 5 à 8 mm) et mis en contact avec des micro-organismes environnementaux (Figure 2) :

- Sur l'une des tiges blessées, application de sol de la plantation, et recouvrement avec l'écorce préalablement prélevée afin d'optimiser la contamination et que le sol ne soit pas trop rapidement délavé par la pluie.
- Sur l'une des tiges, la blessure est intacte au contact de l'air.
- La troisième tige servant de témoin

Nous ferons un suivi de la réaction du bois au stress appliqué, par des observations visuelles et une analyse chimique du bois après une durée d'exposition de 6 mois, 12 mois, 18 mois, 21 mois et 5 ans. L'application du stress a été réalisée en février 2018 (saison des pluies) et en septembre 2018 (saison sèche).

Figure 2 : Pour inoculer les *Aquilaria* avec les champignons environnementaux, les arbres sont sélectionnés avec des troncs ayant minimum 3 fourches.
Ainsi, le tronc de deux des fourches est blessé sur le sens longitudinal de façon à retirer l'écorce et l'aubier sur une épaisseur d'environ 1cm (a et b). Cela est fait à trois reprises sur chaque fourche. Sur une des fourches, les blessures sont laissées à l'air libre pour faciliter la contamination par des champignons environnementaux. Sur l'autre fourche, du sol de la plantation est appliqué sur la blessure et le morceau de bois retiré est replacé sur la blessure pour maintenir la terre et favoriser la contamination.

Observations visuelles

Dans un premier temps, les troncs des arbres ayant reçu des éprouvettes inoculées par des champignons lignivores de Guyane sont abattus puis coupés transversalement en rondelles, au niveau des zones d'inoculation. Sur chacune d'elles, nous avons recoupé ces dernières au niveau des zones inoculées dans le sens radial afin d'observer la propagation de la réponse au stress et de sélectionner une zone pour effectuer une coupe où la limite entre le bois noir et le bois blanc est clairement visible (Figure 1h). Les découpes ont été réalisées à la menuiserie du Laboratoire des Sciences du bois de Kourou.

Pour chacune des rondelles, nous avons pris une photographie (Figure 1i). D'après l'analyse des photographies grâce au logiciel « Image J », on discutera de l'évolution

de la couleur, de l'exsudation et de la propagation du bois noir faisant suite à la réponse de l'arbre à l'induction de la production de bois noir par l'inoculation des différentes souches de champignons. Les surfaces de bois noir ont été mesurées dans le sens de la longueur et de la largeur au niveau de la zone où l'éprouvette a été introduite (Figure 1i). Les comparaisons, entre les surfaces de propagation du bois noir selon les différentes souches de champignons, sont représentées sous la forme de box plots, réalisés avec le package Ggplot2 du logiciel R.

Les arbres ayant fait l'objet d'une contamination par les champignons environnementaux ont été examinés pour la production de bois noir dans des conditions similaires ; des rondelles ont été taillées dans les zones d'inoculation et examinées ensuite en fonction d'éventuelles observations de bois noir.

Inoculations de champignons environnementaux par application de sol ou non sur blessure de l'arbre

Les branches des arbres après 6 et 12 mois de stress ont été débitées en rondelles de 5cm d'épaisseur dans les zones d'inoculation. Chaque rondelle fait l'objet d'une prise de photo de la face transversale pour évaluer la surface de propagation du bois noir.

Conditions expérimentales de l'hydrodistillation des différents échantillons

Après observation visuelle des rondelles, le bois noir a été prélevé pour être broyé en fin copeaux (1 mm), à l'aide d'un moulin à café. Environ 20 grammes de copeaux, par arbre, ont été hydrodistillés dans 350 mL d'eau milli-Q puis nous avons ajouté dans le clevenger un standard interne, le tridécane. La masse de bois n'a pas toujours été respectée au regard de la quantité de bois noir qui n'était pas toujours quantitative. Une série d'essais préalables a été réalisée afin de définir les conditions d'analyse (concentration en standard interne : 4 g/L et 0,04g/L) et durée d'hydrodistillation (3h, 6h, 17h) sur des échantillons de référence (non contaminé). Au terme de ce premier essai nous avons lancé l'ensemble des analyses avec les conditions suivantes : 5 mL de tridecane (0,04 mg/mL) et durée d'hydrodistillation de 8 heures.

Cette analyse a été réalisée sur :

- Bois de référence
- Bois contaminé par les micro-organismes du sol
- Bois contaminé par les micro-organismes après blessure, sans sol

La masse de bois était dépendante de la quantité de matière disponible, mais nous avons conservé pour l'ensemble des analyses le même rapport masse/volume.

Les constituants volatils obtenus par hydrodistillation sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Ainsi, les chromones, qui sont pourtant des composés très importants de l'agarwood, ne sont pas représentés ici, du fait de leur faible volatilité.

L'étalon interne est utilisé pour calculer les rendements.

Conditions expérimentales d'analyses par GC-MS

La Chromatographie Gazeuse couplée à la Spéctrométrie de Masse (GC-MS) est une technique analytique qualitative des composés organiques. Elle permet de recueillir des informations sur les structures des composés présents, même en faible quantité, dans un échantillon.
Ici, le Chromatographe est le modèle 7820 A de la marque Agilent et le Spectrophotomètre est le modèle MSD 5977 de la marque Agilent.
Les conditions opératoires du GC sont les suivantes :
- Température du four : température initiale de 50°C maintenue pendant 5 minutes en utilisant le programme numéro 1 qui est de 10°C/min jusqu'à 250°C.
- Température d'injection : 250°C, split ratio 20:1
- Colonne apolaire : Agilent 19091S-577, HP-5ms, 20 m x 180 µm x 0,18 µm

Les conditions opératoires du MS sont les suivantes :
- MS source : 230°C
- MS quad : 150°C
- Acquisition mode scan
- Spectre de masse [33-350]

RÉSULTATS

Observation des surfaces de propagation du bois noirci

1. Arbres inoculés par les souches de champignons lignivores de Guyane

Après 9 mois de mise en présence avec des éprouvettes de bois, inoculées par des champignons de Guyane de pourriture fibreuse et cubique et les témoins, on remarque un noircissement du bois autour de l'éprouvette inoculée (Figure 19, Supplémentaire). D'une façon générale, on remarque que la propagation du bois noir est plus importante vers l'écorce que vers la moelle. On remarque, également, qu'il y a, dans tous les traitements, un front de propagation du bois noirci, au contact du bois blanc, plus foncé que le bois noirci proche de l'éprouvette.

En ce qui concerne les essais conduits avec des éprouvettes témoins c'est-à-dire non inoculées par un champignon ; pour le « Témoin Hêtre » (TH), après 9 mois une coloration plus claire par rapport aux essais conduits en présence de champignons se développe au contact de l'éprouvette. En revanche, pour les essais conduits avec les éprouvettes de Pin stérilisées non inoculées par un champignon, le « Témoin Pin » (TP), nous observons un bois de couleur relativement foncée, se rapprochant de celle du bois noir issu de l'interaction des *Aquilaria* avec les champignons de pourriture fibreuse testés dans le cadre de cette étude. Enfin, le témoin positif, qui correspond à l'individu testé avec la souche RV de pourriture fibreuse, produit un bois noirci dont la coloration est la plus sombre, en comparaison aux autres essais conduits. Aussi, nous avons observé que la zone de réaction présentait un suintement plus important lors de la découpe du bois.

La réponse du bois à la colonisation par les champignons de pourriture cubique, PP et AV se traduit par une coloration plus claire qu'avec les champignons de pourriture fibreuse GR, PS et CP. Il est à noter que, suite à la colonisation par le champignon GT, on observe un bois de coloration la plus claire, traduisant semble-t-il une réponse moins intense. Il s'avère que ce champignon est connu pour dégrader spécifiquement

la lignine, la cellulose, ou les deux à la fois (Zaremski, 2005). Au regard de la coloration observée, ces résultats indiquent que GT dégrade préférentiellement la lignine ; ainsi il sera considéré comme un champignon de pourriture fibreuse.

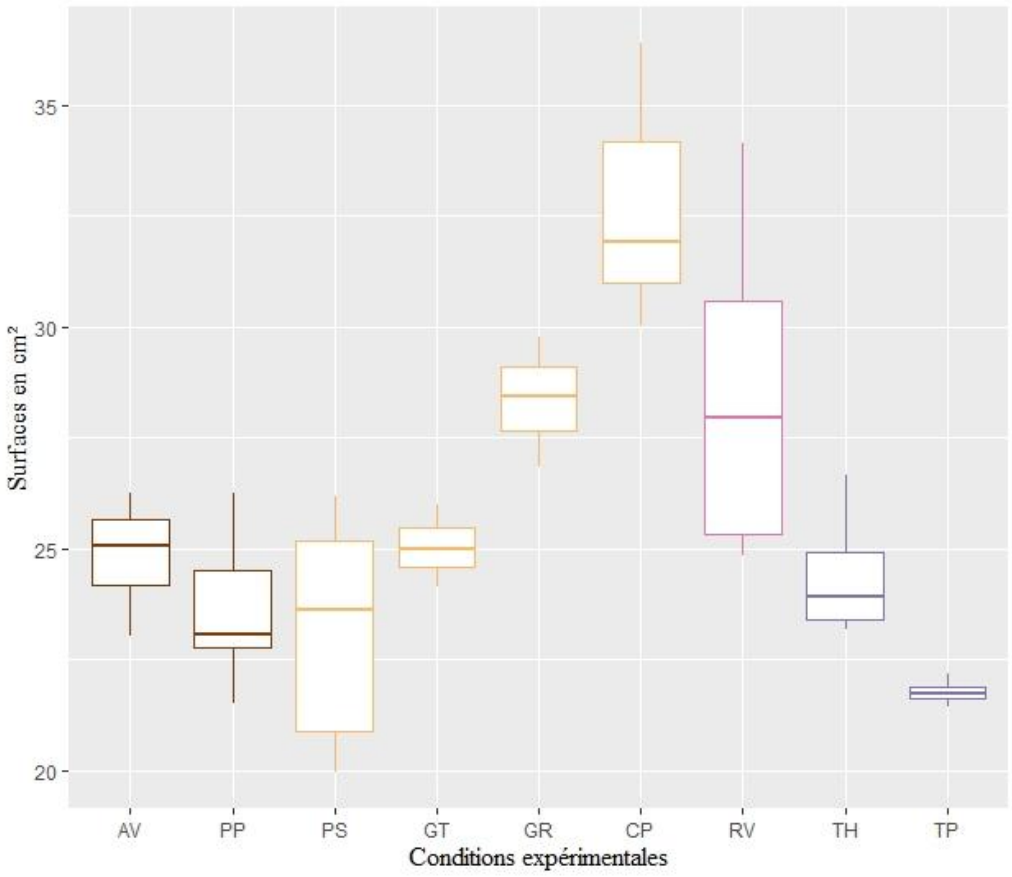

Figure 3 : Représentation graphique des mesures de surfaces de propagation du bois noir dans les *Aquilaria* en plantation en Guyane.
Les champignons de pourriture cubique sont représentés en marron, ceux de pourriture fibreuse en jaune, le témoin positif est représenté en rose et les témoins négatifs en violet. Pour rappel : *Antrodia vaillantii* (AV), *Poria placenta* (PP), *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Gloeophyllum trabeum* (GT), *Ganoderma resinaceum* (GR), *Coriolopsis polyzona* (CP), *Rigidoporus vinctus* (RV), Témoin Hêtre (TH), Témoin Pin (TP).

Les surfaces de propagation du bois noir en fonction des différentes souches de champignons ont été représentées sous forme de box plots, présentés dans la figure 3. Sur la figure 3, quatre groupes se différencient en fonction des surfaces de propagation du bois noirci :

- Surfaces peu étendues (< 22.5 cm²) : TP,
- Surfaces peu à moyennement étendues ([22.5 cm² ; 26 cm²]) : AV, GT, PP, PS, TH,
- Surfaces moyennement à étendues ([26 cm² ; 30 cm²]) : GR, RV,
- Surfaces étendues (> 30 cm²) : CP.

Ainsi, au vu de la Figure 3, le bois contaminé par la souche CP, présente la plus importante propagation de bois noir dans le tronc d'*Aquilaria,* 9 mois après l'inoculation en champs, en comparaison des autres modalités testées (souches de pourritures fibreuses et cubiques, Témoin Pin et Hêtre, sans champignon, Témoin positif RV*)*. Viennent ensuite les souches de pourriture fibreus RV (témoin positif) et de GR. Le bois noir des autres souches de champignons de pourriture fibreuse, des champignons de pourriture cubique et du témoin négatif (« Témoin Hêtre ») est moins étendu. Le témoin négatif « Témoin Pin » induit la réponse la moins quantitative.

2. Arbres colonisés par les communautés microbiennes environnementales après application ou non de sol de la plantation

Après que les arbres aient été stressés 6 mois ou 1 an par blessure de surface avec ajout ou non de sol, l'observation effectuée dans le sens radial à partir d'une rondelle montre que la réaction de l'arbre au stress s'étend sur une profondeur de 2 cm (Figure 20a, Supplémentaire). Elle révèle une réaction de l'arbre sous la forme d'exsudats noirs qui sont solidifiés (Figure 20b, c, d, Supplémentaire). Cette réaction apparaît à partir du phloème secondaire. On observe, ainsi, un mélange de fibres teintées et de sortes de solidifications provoquées par les exsudats qui sont plus denses au touché. Comme attendu, les observations effectuées sur les témoins ne mettent en évidence aucune trace d'exsudats.

Il est intéressant de noter que, dès 6 mois après induction, les réactions des arbres sont apparentes et parfois sous une forme très dense d'exsudats solidifiés (Figure 20b, Supplémentaire). Toutefois, cette réaction dense apparaît sur une très faible profondeur, donc sur une très faible partie des branches stressées. L'analyse des arbres avec stress de 12 mois montre une réaction des arbres allant de faible à très dense (Figure 20c, d, Supplémentaire) mais sur un plus grand nombre de rondelles analysées. L'exsudat de réaction au stress a eu plus de temps pour se propager.

Les composés caractéristiques des échantillons expérimentaux obtenus par hydrodistillation

1. Echantillons de références

Les échantillons de référence sont les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation d'agarwood et de bois blanc issus d'*A. crassna* originaire du Laos, extraites dans notre laboratoire, et d'une huile essentielle d'agarwood obtenue en conditions commerciales. Ces échantillons nous ont permis de mettre en évidence la production d'agarwood suite aux expérimentations conduites en Guyane.

Comme attendu le bois blanc du Laos présente majoritairement la présence d'acide gras notamment de l'acide palmitique (49,84 %). En ce qui concerne le bois noir du Laos, nous observons, dans les échantillons de référence, la présence majoritaire de sesquiterpènes oxygénés (71,82 %) et dans une moindre mesure de sesquiterpènes hydrocarbonés (4,91 % ; Figure 4).

La comparaison de la composition de l'huile essentielle issue de l'agarwood commerciale et du bois noir et du bois blanc du Laos montre la présence de composés tels le valerianol, de l'agarospirol, l'eudesmol, de jinkoh-eremol et de valenca, caractéristiques de l'agarwood (Figure 5). Néanmoins, bien que les profils entre l'agarwood commercial et le bois noir du Laos restent similaires (Figure 6), on observe pour certains marqueurs, tels que le valérianol et l'agarospirol des proportions différentes (supérieures dans le bois noir du Laos par rapport à l'agarwood commercial). Dans le bois blanc, nous observons certains composés spécifiques de l'agarwood, mais en très faible quantité.

Le détail de la totalité des composés caractérisés dans ces échantillons est présenté en éléments supplémentaires dans le Tableau 2 (Supplémentaire).

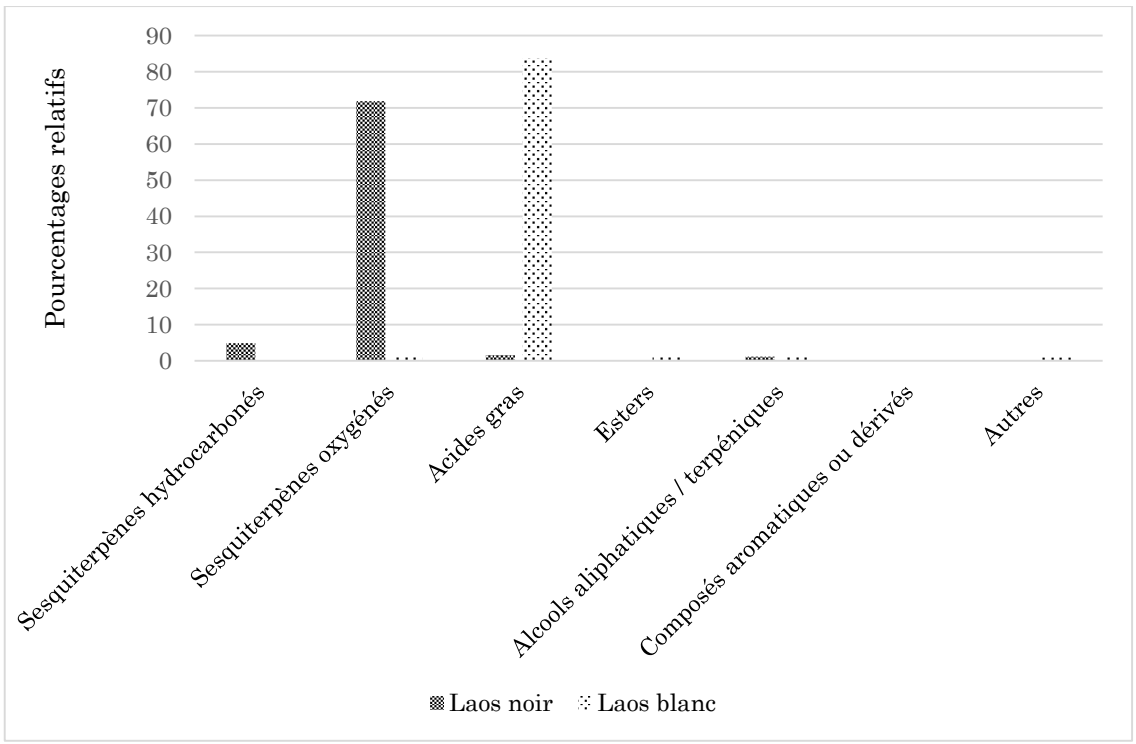

Figure 4 : Proportions des différentes familles de structures moléculaires dans les échantillons de référence de bois noir et de bois blanc du Laos.

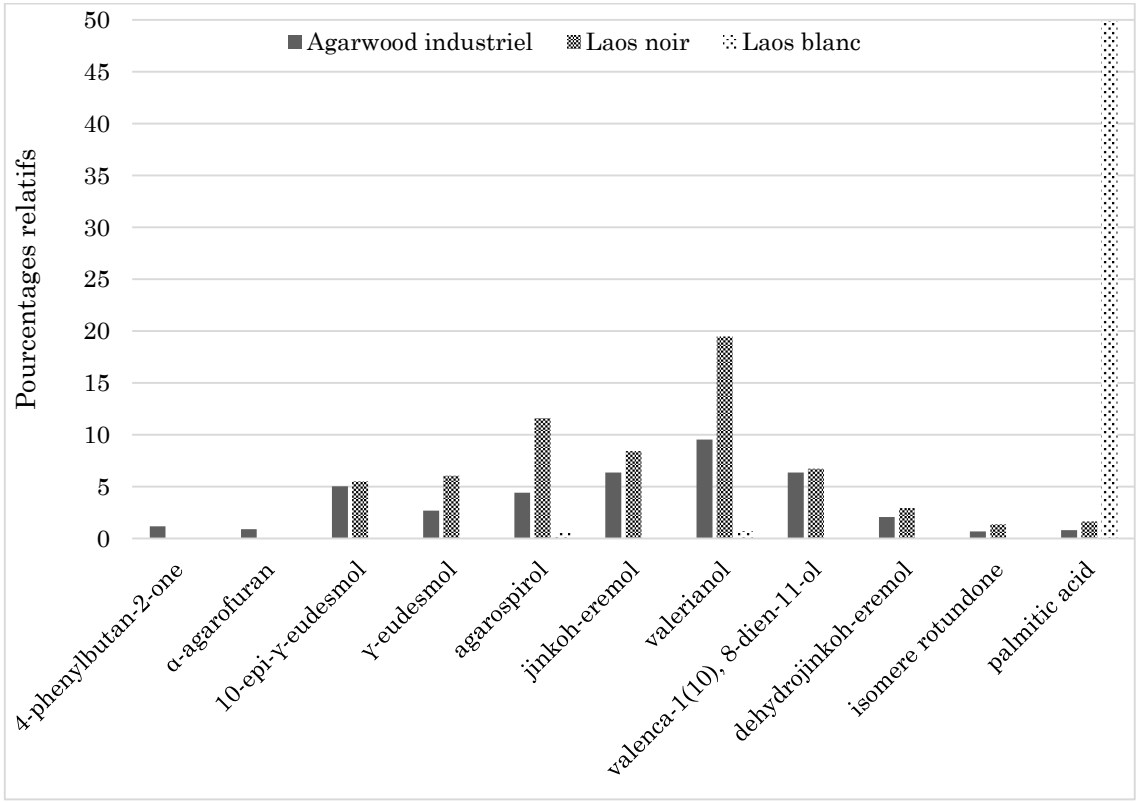

Figure 5 : Pourcentages relatifs sur colonne apolaire des principaux composés volatils caractéristiques dans les échantillons de référence de bois noir et de bois blanc du Laos.

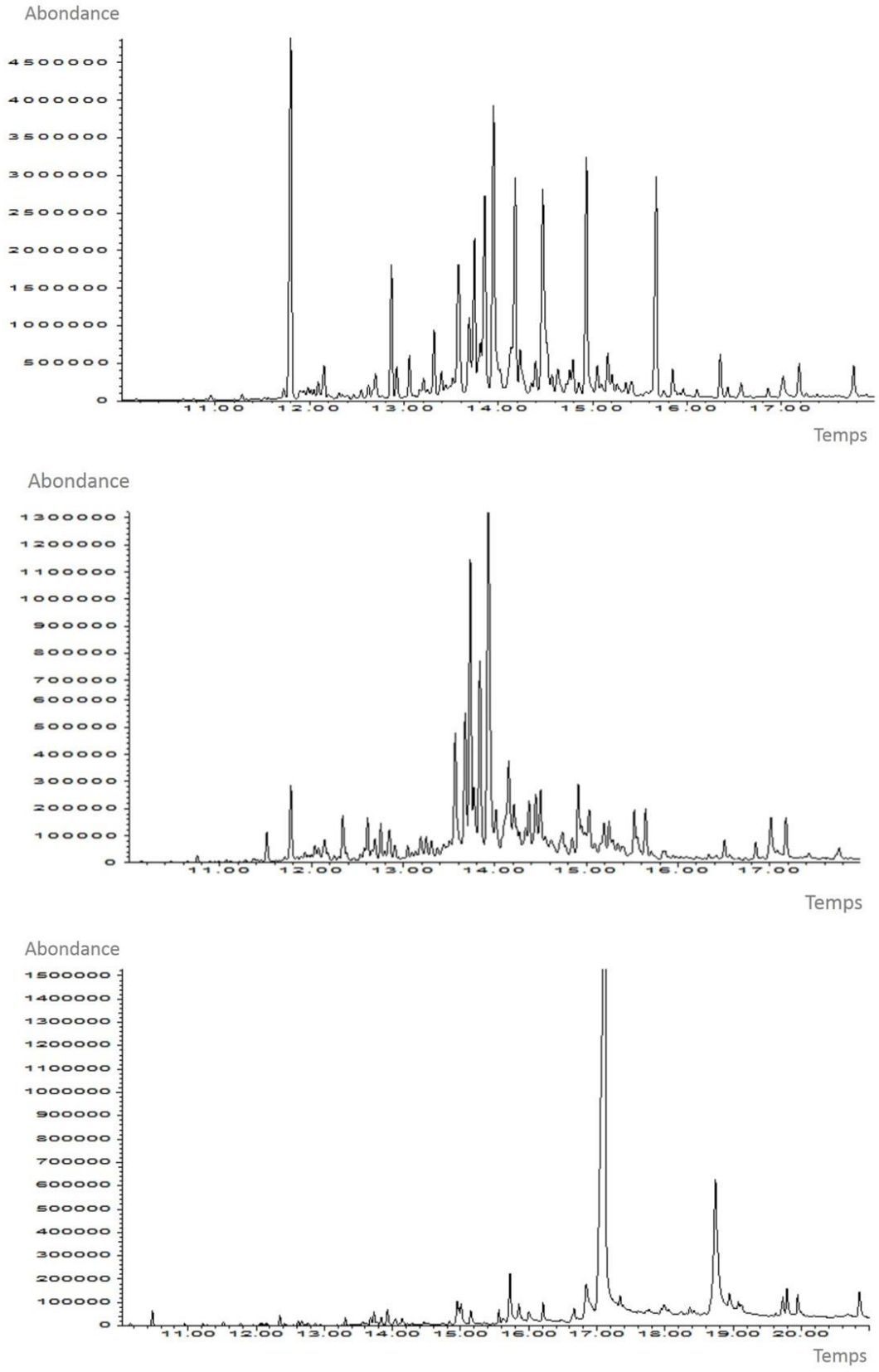

Figure 6 : Chromatogrammes des échantillons de référence. De haut en bas : agarwood industriel, Bois noir Laos, Bois blanc Laos.

2. Echantillons de bois noir des arbres colonisés par les communautés microbiennes environnementales après application ou non de sol de la plantation

L'analyse des huiles essentielles issues des échantillons ayant subi des contaminations avec les microorganismes du sol (AT) ou non (ST) met en évidence des sesquiterpènes oxygénés et de composés aromatiques ou dérivés (Figure 7).

D'un point de vue qualitatif l'analyse des composés du bois noirci de tous les échantillons AT et ST révèle que les composés caractéristiques de l'agarwood, tels que l'eudesmol, l'agarospirol, le jinkoh-eremol, le valerianol et le valenca, ne sont présents qu'en très faible quantité et s'avèrent absents chez certains individus, notamment les ST (Figure 8). En revanche, l'acide palmitique, plutôt caractéristique du bois blanc (Wang *et al.* 2018), est présent dans trois des échantillons (ACG 24-5 ST, ACD 5-3 AT, ACG 24-5 AT), en quantité relativement importante (Figure 8). Les chromatogrammes nous indiquent, en effet, des profils assez plats avec un ou deux pics majoritaires (Figure 9). Cependant, le chromatogramme de l'échantillon contaminé avec du sol de la plantation, ACD 24.5, présente un profil différent, avec plusieurs pics regroupés autour de 14 min (Figure 9), similaire au profil de l'agarwood commercial (Figure 6). Le détail de la totalité des composés caractérisés dans ces échantillons est présenté en éléments supplémentaires dans le Tableau 3 (Supplémentaire). Notons que l'arbre ACG 24.5 présente des caractéristiques propres, qu'il soit contaminé avec les micro-organismes du sol ou pas. En effet, l'huile essentielle provenant du bois contaminé avec les micro-organismes du sol présente une proportion plus élevée (19,59 %) de sesquiterpènes oxygénés par rapport aux huiles essentielles issues des autres individus (de 0 % à 6,12 %). L'huile essentielle extraite de ce même individu mais ayant subi l'autre mode de contamination révèle une proportion d'acide gras supérieure (74,33 %) et la proportion la plus faible en composés aromatiques ou dérivés (2,54 %, Figure 7).

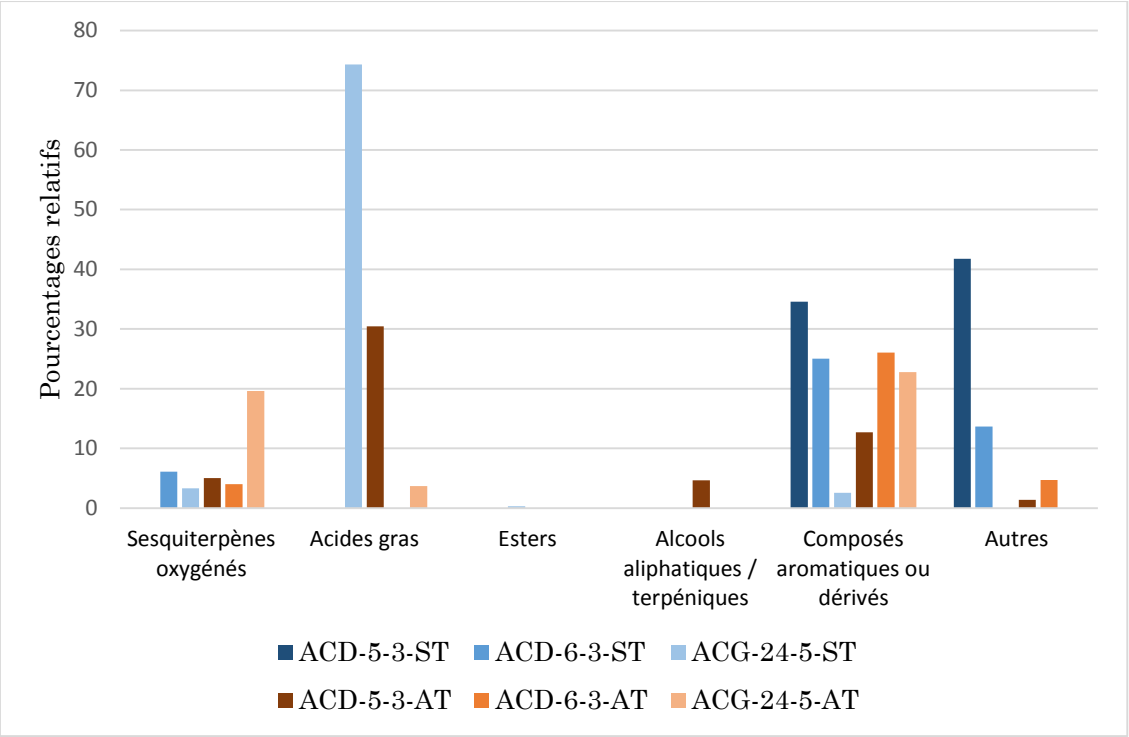

Figure 7 : Proportions des différentes familles de structures moléculaires du bois noir présents chez les trois arbres de l'expérimentation d'inoculation (ACD-5-3, ACD-6-3, ACG 24-5) par application de terre (AT) et blessure de surface (ST).

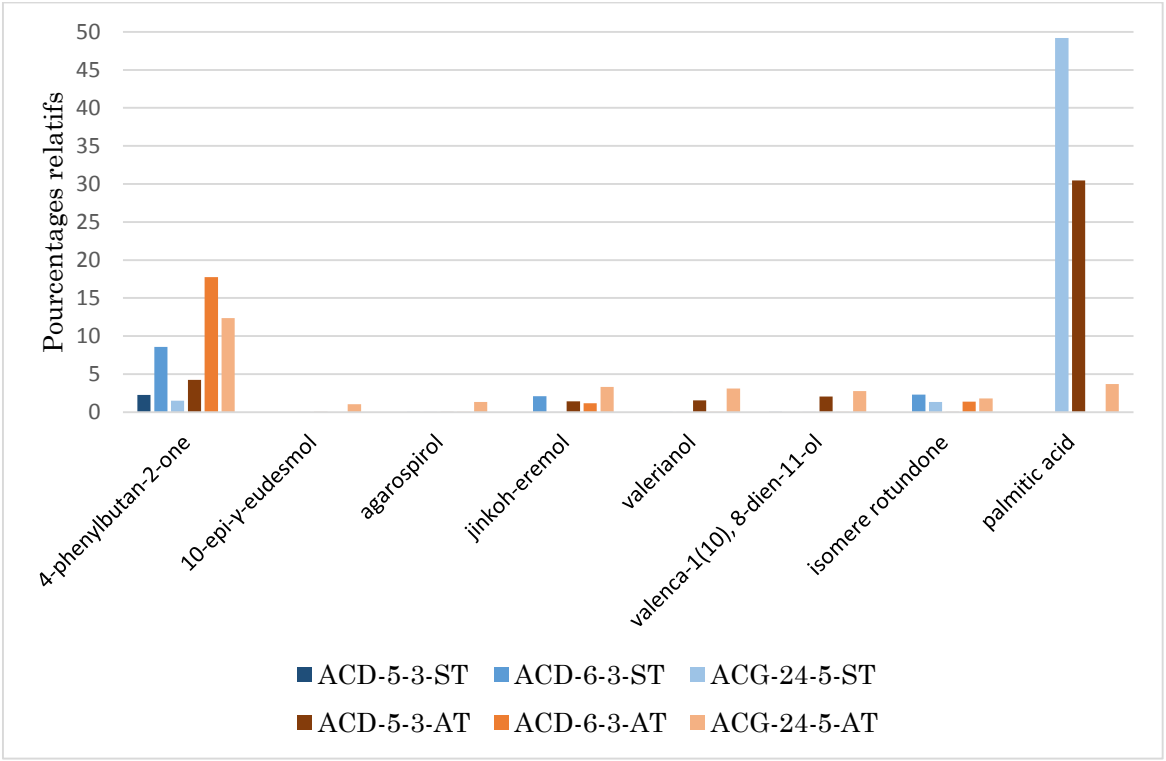

Figure 8 : Pourcentages relatifs sur colonne apolaire des principaux composés volatils caractéristiques du bois noir présents chez les trois arbres de l'expérimentation (ACD-5-3, ACD-6-3, ACG 24-5) d'inoculation par application de terre (AT) et blessure de surface (ST).

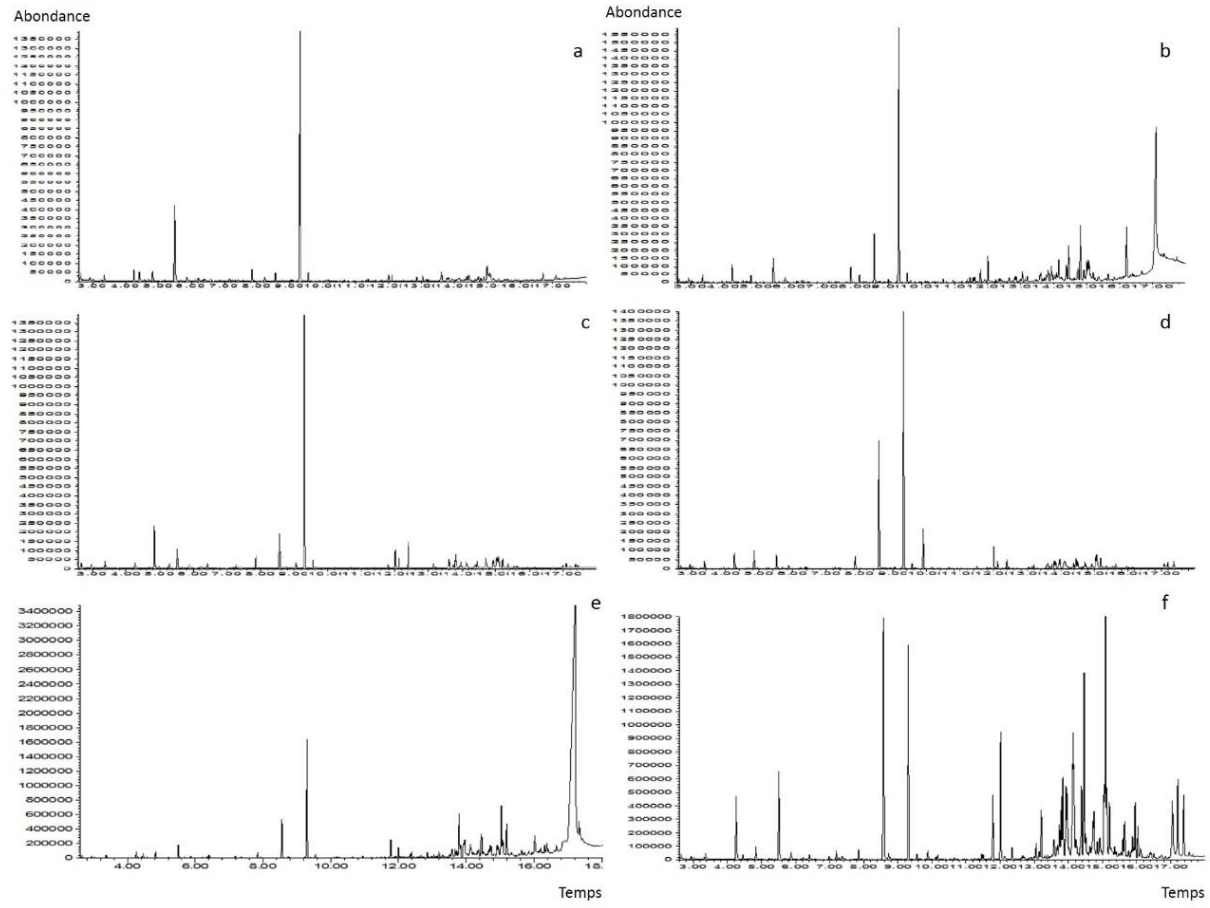

Figure 9 : Chromatogrammes des échantillons de l'expérimentation d'inoculation par les champignons environnementaux
ACD 5.3 sans terre (a) et avec terre (b), ACD 6.3 sans terre (c) et avec terre (d) et ACG 24.5 sans terre (e) et avec terre (f).

3. Echantillons de bois noirci des arbres inoculés par les champignons lignivores de Guyane

La liste des composés identifiés, à partir du bois noirci, obtenue après l'inoculation contrôlée par des souches de champignons lignivores de Guyane et leurs pourcentages relatifs, est présentée dans le Tableau 4 (supplémentaire). Les proportions des différentes familles de structures moléculaires indiquent que les huiles essentielles issues du bois présentent principalement des sesquiterpènes oxygénés et des composés aromatiques ou dérivés (Figure 10).

Nous observons des proportions relativement importantes de phenylbutane, d'eudesmol, d'agarospirol, de jinkoh-eremol, de valenca et de valerianol (Figure 11). Ainsi, les chromatogrammes de ces échantillons, dont trois sont présentés dans la Figure 12, confirme la présence de composés secondaires dont les pics, sont majoritairement

groupés autour de 14 min (Figure 12). On peut mettre en évidence la composition chimique des huiles essentielles selon le type de pourriture impliquée : les pourcentages relatifs des composés du bois noir issus d'échantillons contaminés par les champignons de pourriture cubique AV et PP, sont plutôt similaires. Ce qui n'est pas le cas pour les huiles essentielles issues des contaminations par les champignons de pourriture fibreuse. La comparaison de ces données avec les huiles essentielles issues d'individus contaminés par des éprouvettes de hêtre ou de pin non contaminées permet de mettre en évidence l'influence de l'effet de champignons environnementaux en fonction de l'essence utilisée. Ainsi, la composition de l'extrait issu du témoin négatif TP, semble proche de celle des extraits issus des arbres inoculés par les champignons de pourriture fibreuse. Des acides gras ont été mis en évidence dans les extraits issus de TP. Le témoin positif RV, couramment utilisé pour l'inoculation des *Aquilaria* présente un profil un peu différent, notamment, il est le seul dans lequel on retrouve du γ-eudesmol (Figure 11).

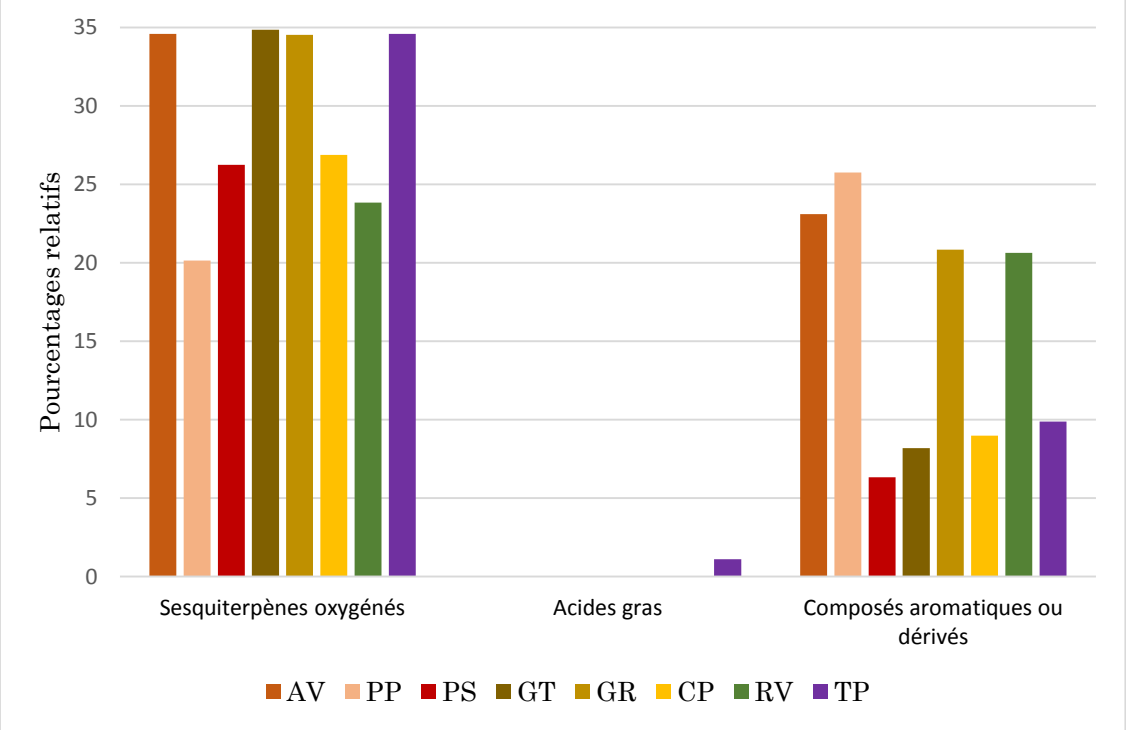

Figure 10 : Proportions des différentes familles de structures moléculaires du bois noir présent chez les arbres inoculés avec les champignons lignicoles de Guyane
***Antrodia vaillantii* (AV), *Poria placenta* (PP), *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Gloeophyllum trabeum* (GT), *Ganoderma resinaceum* (GR), *Coriolopsis polyzona* (CP), *Rigidoporus vinctus* (RV) et un témoin négatif : Témoin Pin (TP).**

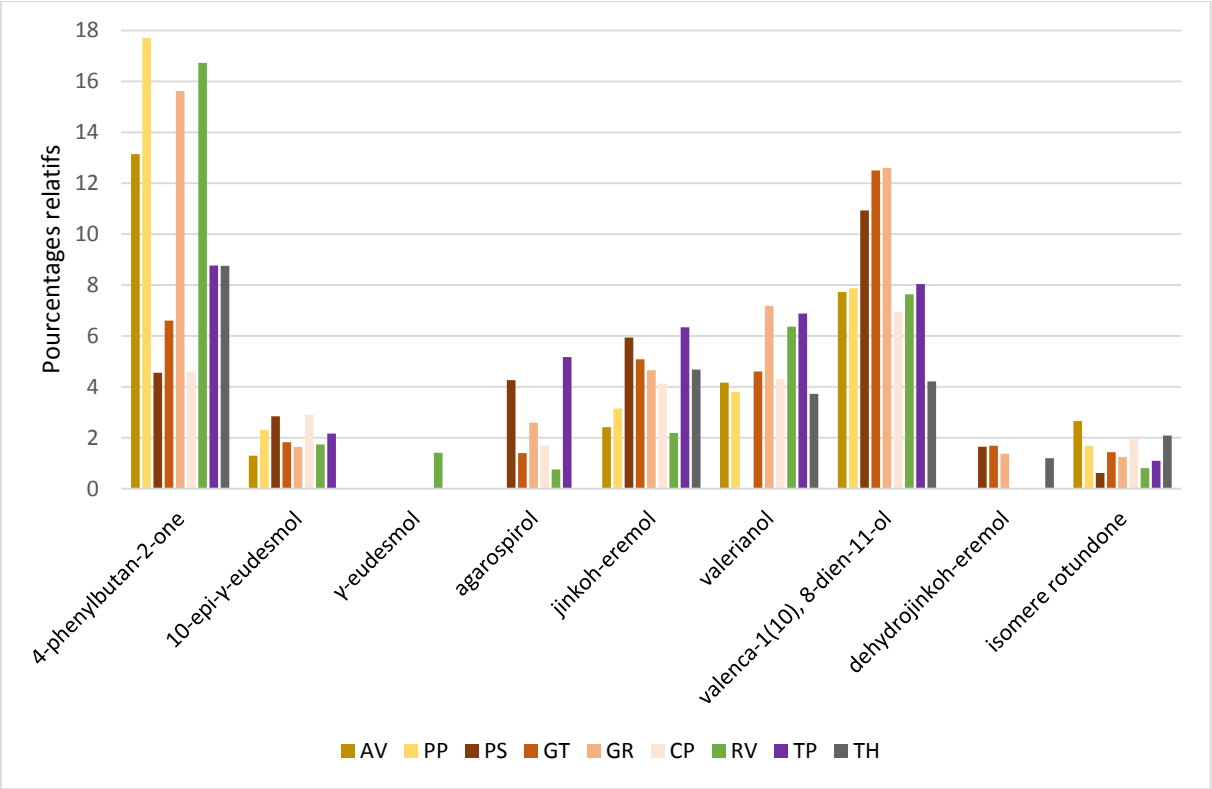

Figure 11 : Pourcentages relatifs sur colonne apolaire des principaux composés volatils caractéristiques de l'agarwood présents chez les arbres inoculés avec les champignons lignicoles de Guyane
***Antrodia vaillantii* (AV), *Poria placenta* (PP), *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Gloeophyllum trabeum* (GT), *Ganoderma resinaceum* (GR), *Coriolopsis polyzona* (CP), *Rigidoporus vinctus* (RV), Témoin Pin (TP), Témoin Hêtre (TH)**

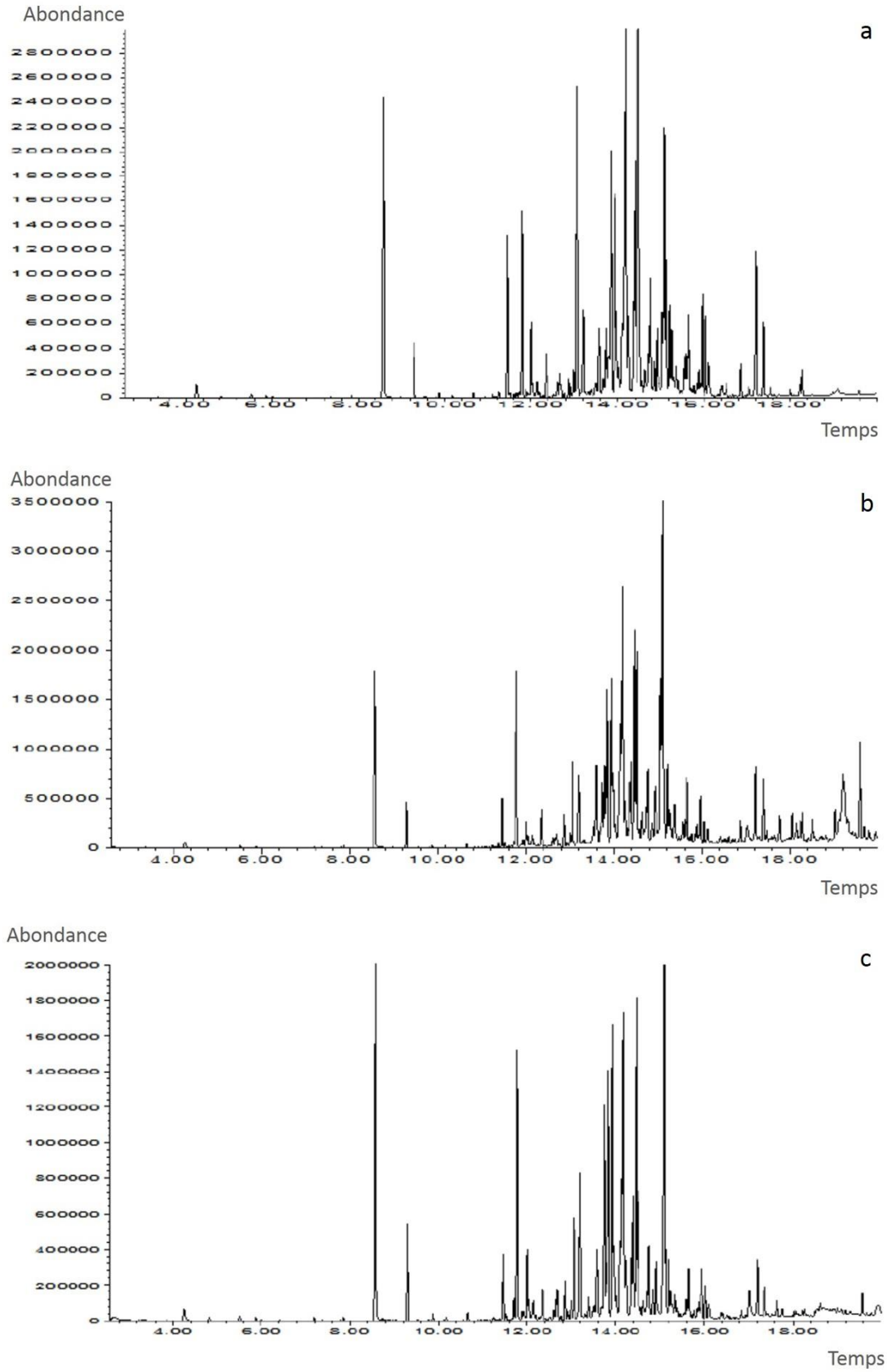

Figure 12 : Chromatogrammes des échantillons extraits de certains arbres inoculés avec les champignons lignicoles de Guyane, dont les profils sont les plus proches de l'agarwood industriel *Gloeophyllum trabeum* (GT) (a), *Coriolopsis polyzona* (CP) (b) ; le Témoin (TP) (c).

4. Analyse globale de tous les échantillons

L'analyse en composantes principales (ACP) des données de l'ensemble des échantillons (Figure 13), permet de mettre en avant que les échantillons de référence d'extraits de bois du Laos, Laos noir et Laos blanc, sont les plus éloignés sur l'axe 1, qui représente les composés caractéristiques de l'agarwood tels que l'eudesmol, l'eremol, l'agarospirol et le valérianol : la composition de l'huile essentielle issue du bois noir se distingue de celle du bois blanc par la présence de ces composés et de l'acide palmitique, caractéristique du bois blanc. L'huile essentielle d'agarwood commercial est davantage proche de l'huile essentielle issue du Laos noir. Concernant les huiles essentielles issues des échantillons contaminés par les différentes souches de champignons, les échantillons les plus proches de l'agarwood commercial sont les échantillons qui ont été inoculés avec des souches de champignons lignivores de Guyane, plus particulièrement avec des champignons de pourriture fibreuse GR, GT, PS et le Témoin Pin TP. Les arbres contaminés avec CP et RV et avec les champignons de pourriture cubique AV et PP sont légèrement différenciés de ce premier groupe selon l'axe 1, étant plus proche du bois blanc que de l'agarwood commercial selon cet axe. Il est à noter que l'échantillon provenant de l'arbre ACG 24.5, contaminé avec les champignons du sol, se retrouve également dans ce groupe. Les échantillons de l'arbre ACD 6.3 contaminés ou pas avec la microflore du sol sont regroupés selon l'axe 1 et l'axe 2. Selon l'axe 2, qui est défini notamment grâce à l'acide palmitique, qui est caractéristique du Bois blanc, les groupes cités ci-dessus sont plus proches de l'agarwood commercial que des échantillons de bois noir et blanc du Laos. En revanche, selon l'axe 1 et l'axe 2, les échantillons avec sol et sans sol de l'arbre ACD 5.3 et l'échantillon sans sol de l'arbre ACG 24.5, sont proches de l'échantillon de bois blanc du Laos.

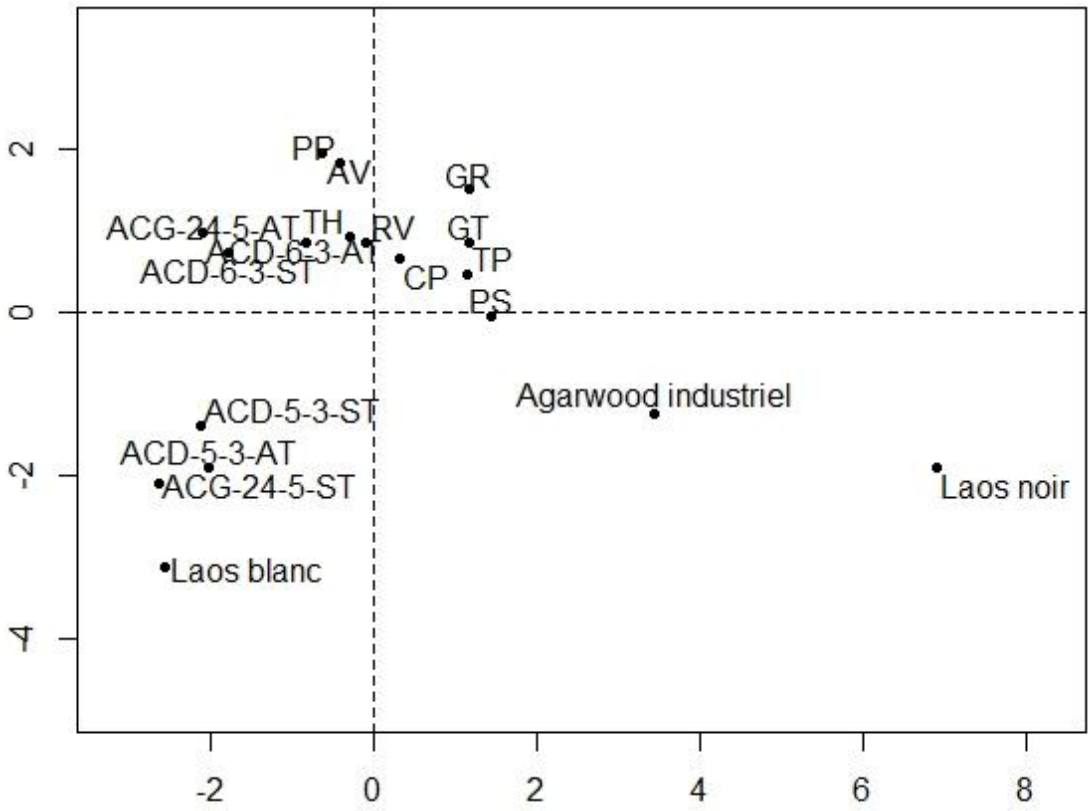

Figure 13 : Analyses en composantes principales (ACP) de la répartition des échantillons en fonction de leurs compositions chimiques.
L'ACP a été réalisée avec le package FactoMineR du logiciel R. L'axe 1 est construit (89%) grâce aux variables 10-epi-γ-eudesmol, jinkoh-eremol, agarospirol, valerianol, dehydrojinkoh-eremol, γ-eudesmol. L'axe 2 est construit (78%) grâce aux variables 4-phenylbutan-2-one, acide palmitique et isomère rotundone.
Avec Terre (AT) ; Sans Terre (ST) ; *Antrodia vaillantii* (AV) ; *Poria placenta* (PP) ; *Pycnoporus sanguineus* (PS) ; *Gloeophyllum trabeum* (GT) ; *Ganoderma resinaceum* (GR) ; *Coriolopsis polyzona* (CP) ; *Rigidoporus vinctus* (RV) ; Témoin Pin (TP) ; Témoin Hêtre (TH).

5. Rendements en HE de l'ensemble des échantillons après hydrodistillation

Les rendements du pourcentage de masse d'huile essentielle obtenus après hydrostillation du bois noirci sont tous inférieurs à 0.20 % (Figure 14). Il faut se rappeler que, à partir de bois blanc, les rendements sont de 0,1 % (1 kg d'huile essentielle est extrait pour 1.000 kg de bois blanc) et de 1 % à partir de bois noir (1 kg d'huile essentielle est extrait pour 100 kg de bois noir) soit un facteur 10 entre les deux types de bois. Ainsi, on peut également noter que trois des arbres contaminés avec des champignons de pourriture fibreuse, PS, GT, CP et le témoin négatif TP, ont un rendement supérieur à 0,1 %. Le bois contaminé par le témoin positif RV s'en approche, avec un rendement de 0,098 %. Les arbres contaminés par des champignons de pourriture cubique AV et PP ont un rendement plus faible, de 0,032 %. Les rendements des

arbres contaminés avec les champignons environnementaux sont plus faibles, allant de 0,00024 % pour l'arbre ACD 5.3 à 0,02 % pour l'arbre ACD 25.5 (Figure 14).

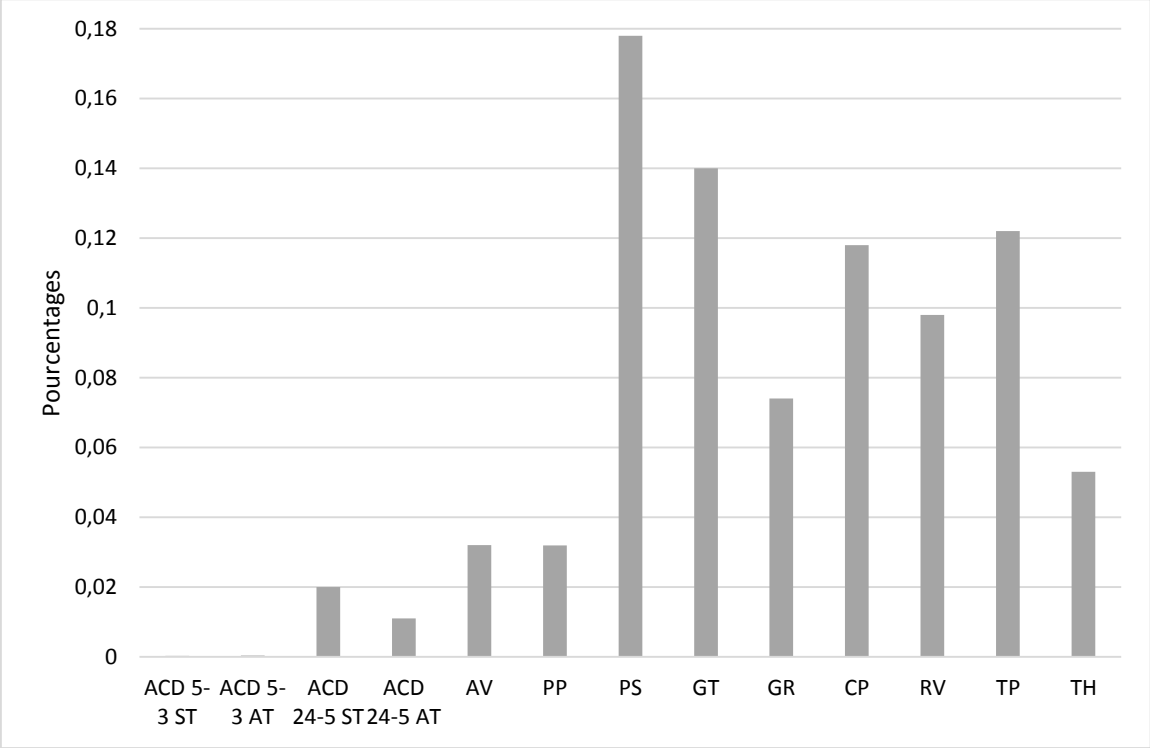

Figure 14 : Rendements en huile essentielle des différents types d'échantillons des expérimentations d'inoculation par des champignons environnementaux et par des champignons lignicoles de Guyane.
Avec Terre (AT) ; Sans Terre (ST) ; *Antrodia vaillantii* (AV) ; *Poria placenta* (PP) ; *Pycnoporus sanguineus* (PS) ; *Gloeophyllum trabeum* (GT) ; *Ganoderma resinaceum* (GR) ; *Coriolopsis polyzona* (CP) ; *Rigidoporus vinctus* (RV) ; Témoin Pin (TP) ; Témoin Hêtre (TH).

DISCUSSION

Cette étude avait pour objectif d'identifier les conditions favorables à la production d'agarwood sur la base de la composition chimique des agarwood induits. Les compositions chimiques des agarwoods induits lors de nos recehrches ont été comparées à celles d'huiles essentielles de référence issue de bois blanc (non contaminé) et d'agarwood de référence. Pour ce faire nous avons conduit deux campagnes d'essais. Dans une première campagne, le stress a été assuré par une blessure le long du tronc suivi par une contamination par des champignons issus du sol et environnementaux. Dans une deuxième campagne, les arbres ont été contaminés spécifiquement par des champignons lignivores de Guyane (pourriture fibreuse et pourriture cubique). Nous avons aussi intégré des témoins (hêtre et pin) qui nous ont permis de discuter de l'influence du support en bois utilisé en tant que vecteur de contamination ainsi qu'un témoin dit positif, le *Rigidoporus vinctus* (RV), qui est couramment utilisé pour la production d'agarwood en Asie (Chen *et al.* 2018).

Il est vrai que la littérature fait état de plusieurs approches permettant d'induire la production d'agarwood (Naziz *et al.* 2019 ; Blanchette *et al.* 2015 ; Tan *et al.* 2019), mais le caractère innovant de cette étude résulte de l'utilisation de champignons environnementaux provenant notamment du sol prélevé au pied de l'arbre, appliqué directement après avoir occasionné une blessure à l'arbre. En effet, même si blesser les arbres d'*Aquilaria* est une technique fréquemment utilisée (Tan *et al.* 2019), appliquer le sol sur la blessure occasionnée n'avait pas encore été expérimenté. De la même façon, insérer des mélanges contenant des micro-organismes est couramment réalisé dans le tronc des arbres d'*Aquilaria* (Blanchette *et al.* 2015 ; Tan *et al.* 2019). Mais, ici, nous avons inséré les champignons sélectionnés en souche pure par le biais d'éprouvettes de bois qui ont également pour but de boucher le trou dans lequel elles sont insérées. Cela a nécessité le développement d'une méthode de contamination à partir d'inoculation de champignons sélectionnés localement.

Ces champignons appartenant à la famille des Basidiomycètes, sont à l'origine de pourriture fibreuse ou cubique afin de comparer la réponse résultant de ces stress chez *Aquilaria*. La sélection de ces champignons fait suite à une étude conduite en amont qui a permis de caractériser les champignons lignicoles et lignivores communs de Guyane (Zaremski *et al.* 2019). Les champignons ont été sélectionnés pour leur

caractère lignivore, leur relative abondance en Guyane et pour être aussi bien des champignons de pourriture fibreuse, dégradant notamment la lignine, que des champignons de pourriture cubique, dégradant la cellulose.

Les premières observations mettent en évidence, comme attendu, une réaction du bois qui se traduit par une coloration plus ou moins développée autour de la zone de stress. En revanche des différences peuvent être mises en évidence en fonction des agents biotiques impliqués. Nous observons que la production de bois noirci, en réponse au stress, est beaucoup plus développée lorsque l'arbre est inoculé par des champignons de pourriture fibreuse et cubique que par des champignons environnementaux du sol ou non. Le champignon de pourriture fibreuse, *Coriolopsis polyzona* est celui qui donne la plus grande surface de propagation de l'agarwood, suivi par *Ganoderma resinaceum* et *Rigidoporus vinctus*, deux champignons de pourriture fibreuse dont le second est le témoin positif. Les champignons de pourriture cubique, les autres champignons de pourriture fibreuse et le Témoin (négatif) Hêtre donnent des surfaces de propagation de l'agarwood plus faible. La surface de propagation associée au Témoin (négatif) Pin est la plus faible.

Nous expliquons certaines de ces différences par la nature de la blessure. En effet dans le cas des arbres contaminés par les micro-organismes du sol, la blessure est occasionnée plutôt en surface sur une faible profondeur (2 cm) tandis qu'avec les arbres contaminés spécifiquement par des champignons de pourriture cubique ou fibreuse, *via* des éprouvettes de bois, la blessure est différente dans la mesure où nous avons effectué, le long de l'arbre, dix trous d'un diamètre de 10 mm d'une profondeur de 8 cm. Ces premières observations nous amènent à préconiser une blessure sur une profondeur suffisante pour obtenir une propagation de l'agarwood plus importante. Les différences entre les champignons lignivores proviennent du type de pourriture et des souches de champignons. En effet, les champignons de pourriture fibreuse permettent des surfaces de propagation de l'agarwood plus importante que les champignons de pourriture cubique. La souche de champignon de pourriture fibreuse *Coriolopsis polyzona* semble produire le plus grand volume de propagation de l'agarwood lors de cette étude.

L'étude de la composition chimique des échantillons après contamination nous permettra de discuter de l'efficacité de la méthode de contamination pour une production

d'agarwood à partir de la recherche de marqueurs spécifiques identifiés dans les huiles essentielles de références issues du Laos et de l'agarwood commercial.

En effet, dans un premier temps, nous avons caractérisé les composés d'huile essentielle des échantillons de référence afin d'établir des chromatogrammes de référence (Figure 6). Il s'agit d'une HE provenant de l'hydrodistillation de bois noir, de bois blanc du Laos et d'agarwood commercial. Nous avons pu confirmer que l'huile essentielle issue de bois noir et d'agarwood commercial présente des sesquiterpènes oxygénés, notamment, l'eudesmol, l'agarospirol, le jinkoh-eremol et le valérianol, qui sont les composés caractéristiques de l'agarwood (Figure 3 ; Naef 2011).

Nous avons observé que les huiles essentielles issues des arbres contaminés par les micro-organismes présents dans le sol prélevé au pied de l'arbre ou par les champignons environnementaux sans application de sol présentent des profils similaires (Figure 9), caractérisés plutôt par la présence de composés aromatiques ou dérivés et d'autres molécules non caractéristiques de l'agarwood (Figure 7). De plus, deux des échantillons, contaminés avec du sol (ACD 5.3) et sans sol (ACG 24.5), présentent une forte teneur en acide palmitique, caractéristique du bois blanc (Wang *et al.* 2018). Cependant, l'échantillon ACG 24.5, contaminé avec du sol, révèle la présence de sesquiterpènes oxygénés, notamment le jinkoh-eremol et le valerianol, et présente un profil plus proche de ceux du bois noir du Laos et de l'agarwood commercial (Figures 6, 9f) permettant de mettre en avant une production d'agarwood.

En revanche, les résultats sur la composition de l'HE issue du bois noirci obtenu par l'inoculation par des souches de champignons sélectionnés sont tout autres. En effet, aussi bien une forte teneur en sesquiterpènes oxygénés que l'absence d'acide palmitique (Figures 10, 11) révèlent des profils en composés volatils proches de ceux obtenus pour le bois noir du Laos et l'agarwood commercial (Figures 6, 12), quelles que soient les souches de champignons expérimentées, de même que pour les huiles essentielles extraites du témoin positif RV et du Témoin Pin TP.

Les échantillons contaminés avec les champignons de pourriture fibreuse, GR, GT et PS, ainsi que le TP, semblent être à l'origine d'un agarwood aux composés volatils proches de ceux de l'agarwood commercial. Ce résultat met en évidence que la présence de certains composés volatils n'est pas due à la présence d'une souche particulière de champignons mais serait plutôt à imputer à la blessure du tronc, qui induirait

la colonisation par des micro-organismes environnementaux. Toutefois, la survie du champignon au sein du tronc, sur une période déterminée, reste à démontrer pour prouver que le choix de la souche de champignon est déterminant dans les caractéristiques de l'agarwood obtenu. Il est à noter que l'huile essentielle extraite du bois noirci du témoin positif, inoculé par RV, que nous avions sélectionné comme tel car c'est un champignon ubiquiste, présent en Guyane, et dont l'utilisation pour induire la production d'agarwood avait été mise en exergue par Chen *et al.* (2018), a une composition chimique plus éloignée de l'agarwood commercial que l'HE issue du bois noirci obtenu après inoculation par l'ensemble des champignons de pourriture fibreuse de notre étude. En revanche, les HE extraites des agarwoods obtenus par inoculation de champignons de pourriture cubique AV et PP présentent des profils plus éloignés de ceux de l'agarwood commercial et du Laos noir que ceux obtenus par inoculation de pourriture fibreuse.

Ainsi, le bois noirci obtenu par inoculation de souches de champignons sélectionnées sur éprouvettes de bois a un assemblage de composés volatils plus proche de celui de l'agarwood commercial que le bois noirci obtenu par l'inoculation de champignons environnementaux et même que le bois noirci du Laos (Figure 13). Cela est particulièrement mis en évidence pour les souches GR, GT et PS.

Enfin, l'étude des rendements nous indique que, d'une façon générale, les rendements après hydrodistillation du bois noir des arbres inoculés par les champignons de pourriture fibreuse, le témoin positif et le témoin négatif sont intéressants (Figure 14) : de 0,074 % à 0,178 %. Les rendements après hydrodistillation du bois noir des arbres inoculés par les champignons de pourriture cubique sont plus faibles que ceux inoculés par les champignons de pourriture fibreuse. En effet, ils sont de 0,032 %.

Comme attendu les rendements après hydrodistillation du bois noir des arbres inoculés par les champignons environnementaux sont beaucoup plus faibles, allant de 0,00024 % à 0,02 %. Plus précisément, le rendement le plus élevé est obtenu par le bois noirci après inoculation de PS. Il est alors intéressant de mettre en évidence que le témoin positif a un rendement plus faible que trois des arbres inoculés avec des champignons de pourriture fibreuse, alors que le bois noirci qui en est issu est le plus sombre. Aussi, le témoin négatif, qui semblait intéressant par son assemblage de composés volatils, l'est moins que le PS et que le GT en termes de rendement. Ce qui

permet de mettre en avant que la présence d'un champignon contribuant à la propagation du bois noir semble donc importante d'un point de vue quantitatif.

Enfin, la comparaison entre la propagation du bois noir en surface et la comparaison des rendements met en évidence que la surface observée ne semble pas corrélable au rendement. Par exemple, PS qui a le plus fort rendement ne présente pas un grand volume de propagation du bois noirci, et on remarque l'inverse pour CP.

En vue des résultats, on peut donc conclure que le mode d'induction du stress et d'inoculation des souches de champignons en inoculation en souche pure sur des éprouvettes de bois est la plus adaptée. Cette méthode est novatrice car l'inoculation des champignons est faite en souche pure. D'un point de vue quantitatif, les souches de champignons de pourriture fibreuse, plus particulièrement les souches *Ganoderma resinaceum* (GR), *Gloeophyllum trabeum* (GT) et *Pycnoporus sanguineus* (PS), sont les plus adaptées pour produire un agarwood à la composition demandée sur le marché. Ces souches ne semblent pas être pas fréquemment utilisées lors d'autres études. Cependant, elles paraissent adaptées à la production d'agarwood en Guyane.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'obtenir le développement d'agarwood dans des *Aquilaria* de Guyane et, plus spécifiquement, de préciser que la méthode d'inoculation à partir de souches pures par l'introduction d'éprouvettes de bois contaminées dans le tronc est la plus appropriée pour induire de l'agarwood de composition chimique contrôlée chez les arbres d'*Aquilaria*. Il s'agit d'une méthode novatrice par rapport aux méthodes relatées dans la littérature : elle exclut totalement tout adjuvant chimique et utilise des souches de champignons largement présentes dans l'environnement proche des plantations de Guyane. Ainsi, nous avons mis en évidence que les champignons de pourriture fibreuse sont les plus efficaces, notamment GR, GT et PS très présents en Guyane. En effet, en présence de ces champignons, le rendement et la composition en composés volatils du bois faisant suite à cette contamination sont les plus proches de ceux issus d'un agarwood de référence récolté au Laos. Pour tendre vers une production d'agarwood de composition chimique contrôlée, en Guyane, nous préconisons l'utilisation de ces champignons.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Projet Aquil@Guyane: Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'« *Aquilaria* (Agarwood) » haut de gamme, et de produits dérivés, en Guyane, co-financé par l'Europe, la Collectivité Territoriale de Guyane et le CIRAD : Fonds de développement régional (FEDER) pour la Guyane française (convention n ° FEDER / 2017 / N ° 31).

Nous tenons à remercier tout particulièrement les agriculteurs Messieurs Ya Hu, Didier Tcha et Pierre Tcha pour leur investissement dans la mise en place et le suivi des parcelles expérimentales et pour leur disponibilité sans faille lorsqu'il s'agit de nous assister lors des prélèvements en champs.

Nous remercions très chaleureusement nos collègues Dr. Alba Zaremski, Dr. Jacques Beauchêne, Dr. Deborah Fernand, Messeiurs Arnaud Jahn-Oyak, Julien Passelande et Soepe Koese pour leur participation à différentes étapes de cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barden A, Anak NA, Mulliken T, Song M (2000) Heart of the matter: agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis*. Traffic network report, *TRAFFIC International*, Cambridge, 60 p. Url: http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Traf-072.pdf

Blanchette RA, Jurgens JA, Heuveling van Beek H (2015) Growing *Aquilaria* and production of agarwood in hill agro-ecosystems. In: *Integrated Land Use Management in the Eastern Himalayas*. Eds K. Eckman and L. Ralte. Delhi, India, p. 66-82

Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), 2004. "Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Consideration of proposals for amendment of appendices-I and –II *Aquilaria* spp. and *Gyrinops* spp.". In: *Proceedings of the Thirteen Meeting of the Conference of the Parties*, Bangkok, Thailand, October 2 to 14, 2004

Chen X, Liu Y, Yang Y, Feng J, Liu P, Sui C, Wei J (2018) Trunk surface agarwood-inducing technique with *Rigidoporus vinctus*: An efficient novel method for agarwood production. *PLOS ONE* 13(6): e0198111, doi: 10.1371/journal.pone.0198111

Deep K, Tajuddin N (2019) King of scents — Agarwood. *Perfumer & flavorist* 44(3) : 42-56

Fougerousse M (1979) Préservation des menuiseries contre la pourriture. *Bois et Forêts des Tropiques* 183: 49-66

Gratzfeld J, Tan B (2008) Agarwood - saving a precious and threatened resource. *Botanic Garden Conservation International* 5(1), Special issue: *Conserving forest biodiversity*: 27-29

Kalita J, Bhattacharyya PR, Boruah HP, Unni BG, Lekhak H, Nath SC (2015) Association of *Zeuzera conferta* Walker on agarwood formation in *Aquilaria malaccensis* Lamk. *Asian J. Plant Sci. Res.:* 5: 4–9

Lee SY, Mohamed R, Faridah-Hanum I, Lamasudin DU (2017) Utilization of the internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence to trace the geographical sources of *Aquilaria malaccensis* Lam. populations. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 16(02): 103–111, doi: 10.1017/S1479262117000016

Mohamed R, Jong PL, Zali MS (2010) Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Diversity* 43: 67-74

Mohamed R, Jong PL, Nurul Irdayu I (2014) Succession patterns of fungi associated to wound-induced agarwood in wild *Aquilaria malaccensis* revealed from quantitative PCR assay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(9): 2427–2436, doi: 10.1007/s11274-014-1668-2

Naef R (2011) The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review. *Flavour and Fragrance Journal* 26(2): 73–87, doi: 10.1002/ffj.2034

Naziz PS, Das R, Sen S (2019) The scent of stress: evidence from the unique fragrance of agarwood. *Frontiers in Plant Science* 10:840, doi: 10.3389/fpls.2019.00840

Pripdeevech P, Khummueng W, Park SK (2011) Identification of odor-active components of agarwood essential oils from Thailand by Solid Phase Microextraction-GC/MS and GC-O. *The Journal of Essential Oil Research* 23(4): 46-53. https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700468

Rasool S, Mohamed R (2016) Understanding agarwood formation and its challenges. In: Agarwood: Science behind the fragrance, Eds Mohamed R., Springer, Singapore, p. 39-56. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0833-7_3

Sadgopal (1960) Explanatory studies in the development of essential oils and their constituents in aromatic plants. Part 1: *Oil of Agarwood*. SPC 33: 41-46

Soehartono T, Mardiastuti A (1997) The current trade in *Gaharu* in West Kalimantan. *Biodiversitas Indonesia* 1: 1-10

Tan CS, Isa NM, Ismail I, Zainal Z (2019) Agarwood induction: current developments and future perspectives. *Frontiers in Plant Science* 10: 122, doi: 10.3389/fpls.2019.00122

Wang MR, Li W, Luo S, Zhao X, Ma CH, Liu SX (2018) GC-MS Study of the chemical components of different *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilgorgans and agarwood from Different *Asian countries. Molecules* 23 (9), 2168. https://doi.org/10.3390/molecules23092168

Zaremski A (2005) Les Aphyllophorales impliquées dans la dégradation du bois : taxonomical characterisation, phylogeny and early detection of infection. Marseille : *Université de Provence*, Marseille, 148 p

Zaremski C, Ducousso-Détrez A, Amusant N, *et al.*(2019) Taxonomic study of French Guiana fungi to identify and isolate pure cultured fungi for oleoresin production in *Aquilaria*: use of sequences from the small ribosomal DNA (r) subunit (SSU) and the two primer pairs SR6/SR10R and SR7/SR1R. *PRO Ligno* 15(3): 3-15

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, *et al.* (2018) NGS identification of fungi potentially implicated in the production of agarwood from *Aquilaria* spp. Trees. *PRO Ligno* 14(3): 9-18

TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES

Tableau 2 : Détails des composés des échantillons de référence

				% relatifs sur colonne apolaire		
Composé	***Ri littérature***	***Ri calculé apolaire***	***Ri calculé polaire***	***Laos noir***	***Laos blanc***	***Agarwood "commercial"***
hexanoic acid	967	993	1846	-	12,76	-
hexahydro-benzoic acid	1124	1120	2094	-	0,96	-
octanoic acid	1167	1171	2062	-	0,94	-
4-phenylbutan-2-one	**1241**	**1248**	**1864**	**traces**	**-**	**1,18**
hexyl caproate	1385	1386	~1610*	-	0,47	-
α-humulene	1452	1467	1675	1,05	-	traces
MW = 220	-	1487	1732	2,76	-	9,95
α-selinene	1498	1507	~1675*	traces	-	traces
γ-cadinene	1513	1526	1763	traces	-	-
δ-cadinene	1522	1534	1760	2,29	-	-
α-calacorene	1544	1556	1924	1,57	-	-
***α*-agarofuran**	**1548**	**1563**	**1861***	**traces**	**-**	**0,90**
(E)-nerolidol	1561	1568	2036	1,17	-	-
MW = 218	-	1576	1899	1,20	-	3,24
10-epi-γ-eudesmol	**1622**	**1637**	**2111**	**5,51**	**-**	**5,04**
γ-eudesmol	**1630**	**1646**	**2172**	**6,06**	**-**	**2,68**
agarospirol	**1646**	**1651**	**2180**	**11,62**	**0,52**	**4,43**
hinesol	1640	1654	2191	2,74	-	traces
jinkoh-eremol	**1643**	**1660**	**2205**	**8,44**	**-**	**6,35**
valerianol	**1656**	**1668**	**2218**	**19,46**	**0,70**	**9,54**
MW = 218	-	1675	-	2,00	-	-
valenca-1(10), 8-dien-11-ol	**?**	**1687**	**2322**	**6,72**	**-**	**6,36**

dehydrojinkoh-eremol	**1673**	**1692**	**2337**	**2,93**	**-**	**2,08**
acorenone	1700	1707		2,18	-	1,14
B MW = 218	-	1714	-	2,92	-	7,61
MW= 220	-	1719	-	2,77	-	- 7,01
MW = 218	-	1757	2297	2,79	traces	-
MW = 222	-	1760	-	1,20	-	-
tetradecanoic acid	1758	1761	~2690*	-	1,	- 0,94
MW = 228	-	1766	2302	-	39	-
MW = 218	-	1768	2374	2	0,97	**0,69**
pentadecanol	1773	1779	-	,	-	- 6,40
isomere rotundone iso-	**1712**	**1783**	**2361**	2	0,	-
mere dehydrofukinone	1775	1814	2430	2	70	-
MW = 218	-	1826	2470	-	**-**	-
MW = 242	-	1834	-	**1,37**	-	-
MW = 242	-	1847	-	2,80	-	- 0,80
hexadecanol	1874	1881	~2380*	1,87	2,	0,88
methyl palmi-	1912	1927	~2210*	-	60	-
tate palmitoleic	1939	1945	~2940*	-	1,16	-
acid palmitic	1960	1972	~2931*	-	0,65	
acid	1918	1978	-	-	0,75	
isomere dihydrocolumellarine	2135	2146	~3157*	-	3,82	
oleic acid	2132	2168	-	1	49,84	
Total déterminés (%)				99,2	92,01	77,22

[X] = ref MS

* = RI polaire littérature (RI = Indice de rétention)

Tableau 3 : Détail des composés des échantillons de l'expérimentation d'inoculation par les champignons environnementaux

			Pourcentages relatifs présents						
Composé	*Ri littérature*	*Ri calculé*	*ACD 5-3 ST[a]*	*ACD 5-3 AT[a]*	*ACD 6-3 ST[a]*	*ACD 6-3 AT[a]*	*ACG 24-5 ST[a]*	*ACG 24-5 AT[a]*	*ACG 24-5-T*
nonane	900	900	1,43	-	0,96	0,91	-	-	2,22
benzaldehyde	952	964	3,58	1,73	2,00	1,61	traces	2,44	-
octanal	998	1004	2,59	-	10,5	2,31	-	-	2,78
benzenacetaldehyde	1036	1047	21,79	2,24	5,34	2,09	0,57	3,30	14,29
dodecane	1200	1200	3,17	1,39	2,2	1,49	-	-	4,97
4-phenylbutan-2-one	1241	1249	2,27	4,23	8,58	17,76	1,52	12,37	-
2-methoxy-4-vinylphenol	1313	1319	2,28	2,24	2,03	0,69	-	-	-
MW = 220	1487*	1488	-	1,18	-	-	0,81	2,31	-
4-(4-methoxyphenyl)-2-butanone		1505	1,91	2,24	4,59	2,99	0,45	4,68	-
benzophenone	1610	1640	2,74	traces	2,50	0,91	-	-	-
10-epi-γ-eudesmol	**1622**	**1637**	**-**	**traces**	**-**	**-**	**traces**	**1,06**	
γ-eudesmol	**1630**	**1646**	**-**	**traces**	**-**	**-**	**traces**	**traces**	**-**
agarospirol	**1646**	**1651**	**-**	**traces**	**traces**	**traces**	**traces**	**1,34**	**-**
jinkoh-eremol	**1643**	**1659**	**-**	**1,42**	**2,11**	**1,16**	**traces**	**3,30**	**-**
valerianol	**1656**	**1667**	**-**	**1,54**	**traces**	**traces**	**traces**	**3,09**	**-**
neo-intermedeol	1660	1672	-	traces	1,71	1,44	1,95	2,70	-
valenca-1(10), 8-dienol	1687*	1687	traces	2,04	-	traces	traces	2,78	-
dehydrojinkoh-eremol	1673	1693	-	-	-	-	traces	traces	-
MW = 218	1714*	1714	1,88	3,30	1,75	-	1,39	7,56	-
acorenone B	1700	1740	-	-	-	-	traces	1,76	-
MW = 218	1757*	1758	-	traces	-	-	0,55	1,00	-
MW = 218	1768*	1768	1,36	1,52	-	1,80	2,31	2,65	-
isomère rotundone	**1712**	**1783**	**-**	**traces**	**2,30**	**1,38**	**1,36**	**1,81**	**-**
isomere dehydrofukinone	1775	1826	-	traces	-	-	-	1,85	-
pentadecanoic acid	1860	1863	-	-	-	-	1,19	-	-
hexadecanol	1874	1881	-	4,66	-	-	-	-	-
methyl palmitate	1912	1926	-	-	-	-	0,33	-	-
palmitoleic acid	1939	1951	-	-	-	-	1,55	-	-
palmitic acid	1960	1982	-	30,46	-	-	49,21	3,71	-
linoleic acid ?	2110		-	-	-	-	22,38	-	-
Total déterminés (%)			45	60,19	46,57	36,54	85,57	59,71	24,26

*: RI provenant de notre base de données (cf. Tableau 1)

[a]: conditions expérimentales des échantillons dans la partie expérimentale (cf.VII)

Tableau 4 : Détail des composés des échantillons de l'expérimentation d'inoculation par les champignons lignivores de Guyane

			Pourcentages relatifs présents								
Composé	Ri littérature	Ri calculé	GT 1907 [a]	PS 2014 [a]	PP 2106 [a]	CP 2213 [a]	AV 2303 [a]	TP 2701 [a]	GR 2408 [a]	RV 3411 [a]	TH
benzaldehyde	952	964	traces	traces	traces	traces	traces	traces	0,98	0,91	traces
4-phenylbutan-2-one	1241	1249	6,6	4,56	17,71	4,6	13,15	8,77	15,62	16,73	8.75
MW = 220	1487*	1487	3,32	6,43	3,74	4,08	2,35	5,84	3,54	4,08	4.46
butanone	1473	1505	1,58	0,78	3,31	traces	2,52	1,11	2,58	1,48	traces
α-selinene	1498	1508	-	-	-	traces	traces	traces	-	-	traces
β-dihydroagarofuran	1503	1516	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces
MW = 218	1576*	1576	-	1,10	-	0,74	-	0,8	-	-	**0,80**
10-epi-γ-eudesmol	**1622**	**1637**	**1,83**	**2,84**	**2,31**	**2,9**	**1,3**	**2,17**	**1,63**	**1,74**	**traces**
γ-eudesmol	**1630**	**1646**	**-**	**traces**	**traces**	**traces**	**traces**	**traces**	**traces**	**1,41**	**traces**
agarospirol	**1646**	**1650**	**1,4**	**4,26**	**traces**	**1,69**	**traces**	**5,17**	**2,59**	**0,76**	**traces**
hinesol	1640	1654	-	-	-	-	-	-	0,81	-	**traces**
jinkoh-eremol	**1643**	**1659**	**5,08**	**5,94**	**3,15**	**4,13**	**2,42**	**6,34**	**4,65**	**2,19**	**4,68**
valerianol	**1656**	**1668**	**4,61**	**traces**	**3,80**	**4,3**	**4,17**	**6,88**	**7,18**	**6,36**	**3,73**
neo-intermedeol	1660	1670	1,52	traces	1,31	1,25	1,26	1,47	traces	traces	1,42
valenca-1(10), 8-dien-11-ol	**1687***	**1687**	**12,5**	**10,93**	**7,88**	**6,96**	**7,73**	**8,04**	**12,6**	**7,64**	4,22
dehydrojinkoh-eremol	1673	1693	1,69	1,65	traces	traces	traces	traces	1,37	traces	1,20
MW = 218	1714*	1714	13,16	11,13	9,56	6,05	10,47	7,92	14,42	6,61	5,38
Acorenone B	1700	1741	2,3	-	-	1,8	4,13	2,09	1,82	1,76	3,74
MW = 218	1757*	1757	1,47	1,64	traces	1,96	-	1,38	0,65	1	5,85
MW = 218	1768*	1768	1,51	traces	4,84	4,78	1,78	-	-	1,55	1,63
isomère rotundone	**1712**	**1783**	**1,44**	**0,62**	**1,69**	**1,96**	**2,65**	**1,09**	**1,24**	**0,8**	**2,09**
o-costol	1773	1787	0,88	traces	traces	traces	traces	traces	0,65	traces	1,52
isomère dehydrofukinone	1775	1827	1,6	1,61	-	1,88	-	1,35	-	1,17	1,24
palmitic acid	1960	1962	-	traces	-	-	-	1,1	-	-	-
3,6-dimethyl-phenanthrene	2037	2071	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5-diphenyl-1-penten-3-one	?	2185	-	-	-	-	-	-	-	0,68	-
Retene	2214	2240	-	0,99	4,74	2,34	1,22	traces	0,69	traces	4.56
methyl dehydroabietate	2288	2361	-	1,41	6,16	2,04	6,22	traces	0,96	0,84	5.90
Total déterminés			62,49	55,89	70,20	53,46	61,37	61,52	73,98	57,71	61,17

*: RI provenant de notre base de données (cf. Tableau 1)

[a]: conditions expérimentales des échantillons dans la partie expérimentale (cf.VII)

FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Figure 15 : La Guyane se situe en Amérique du Sud, proche de l'équateur. Cacao se trouve en Guyane, au Sud-Ouest de Cayenne, sur la rivière La Comté.
D'après www.assistancescolaire.com et www.cartes-2-france.com

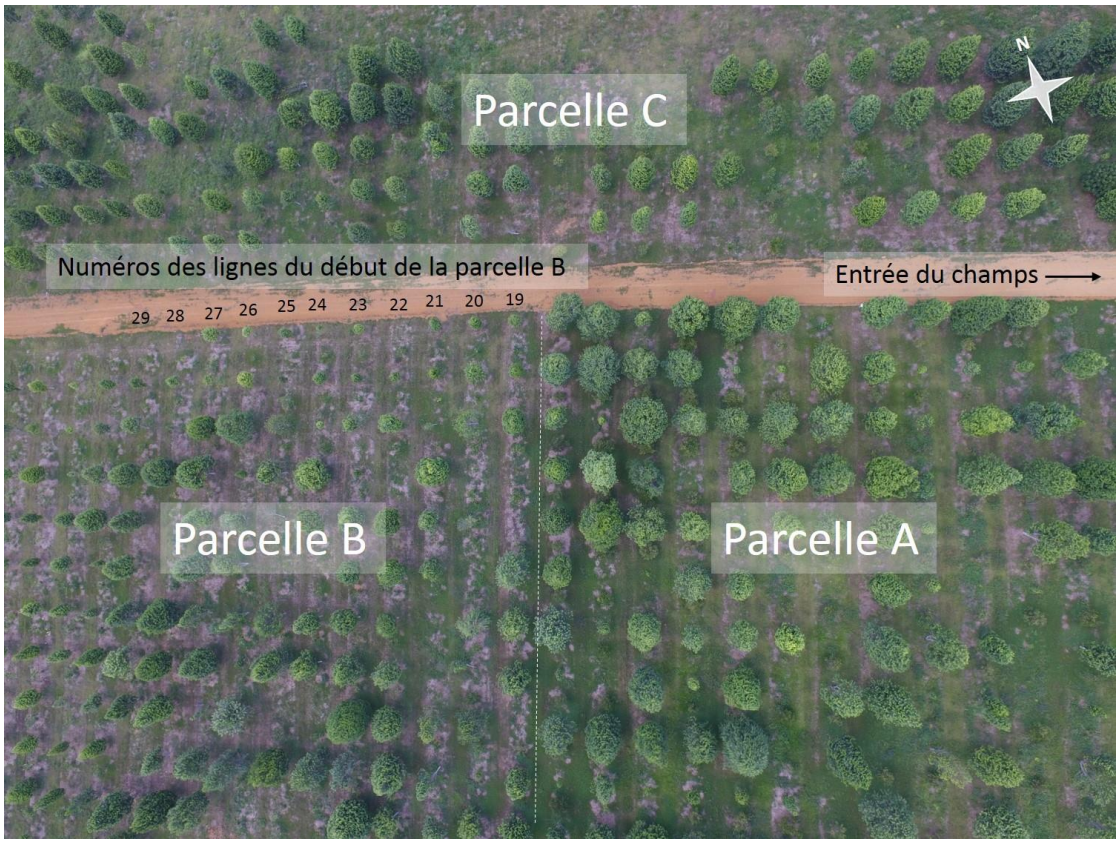

Figure 16 : Le site d'étude est une plantation expérimentale mise en place dans le village de Cacao, en Guyane. Pour nos différentes études, la plantation est divisée en trois parcelles. Pour cette étude les arbres sont situés sur les parcelles B et C, dont le détail des numéros du début de la parcelle B est présenté sur la photographie. Les arbres sont plantés espacés de 4 mètres de chaque côté. Les arbres d'*Aquilaria* sont plantés en alternance avec des agrumes. Le sol est recouvert par une Fabaceae.

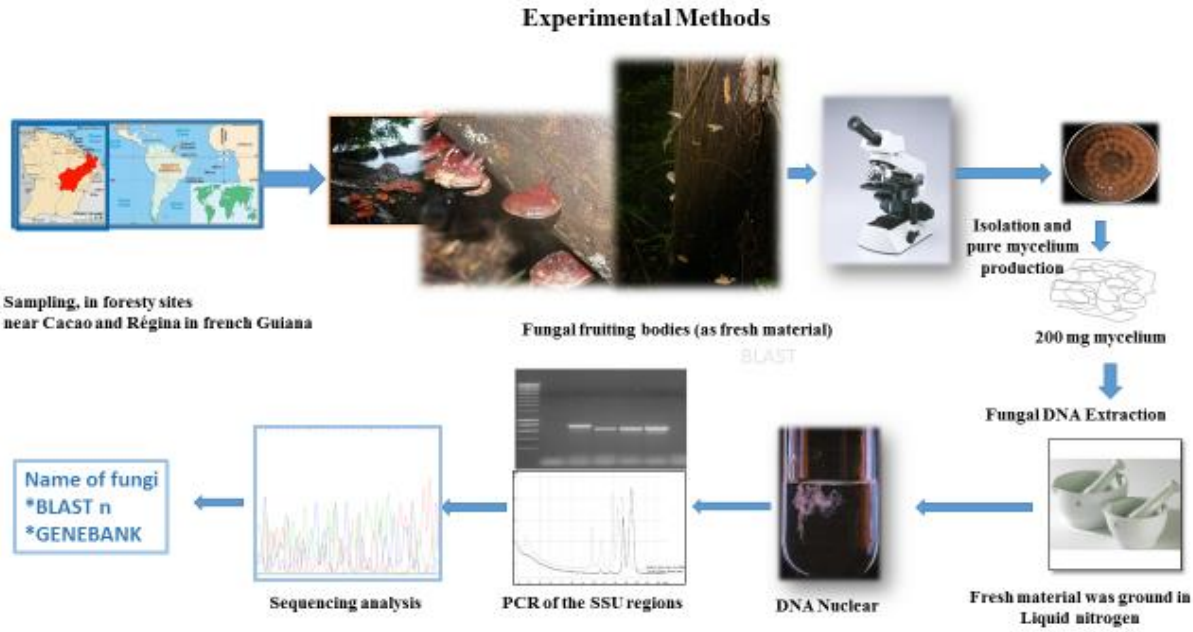

Figure 17 : Les étapes nécessaires pour la caractérisation moléculaire des champignons étudiés, de l'échantillonnage à l'identification moléculaire.

Figure 18 : Exemple de culture de *Pycnoporus sanguineus* après ajout d'éprouvettes stérilisées de hêtre.

Figure 19 : Photographies de chacune des conditions d'inoculation et des témoins après découpe selon la Figure 1.h & i.
Témoin Pin (TP), Témoin Hêtre (TH), *Rigidoporus vinctus* (RV), *Poria placenta* (PP), *Antrodia vaillantii* (AV), *Ganoderma resinaceum* (GR), *Gloeophyllum trabeum* (GT), *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Coriolopsis polyzona* (CP).

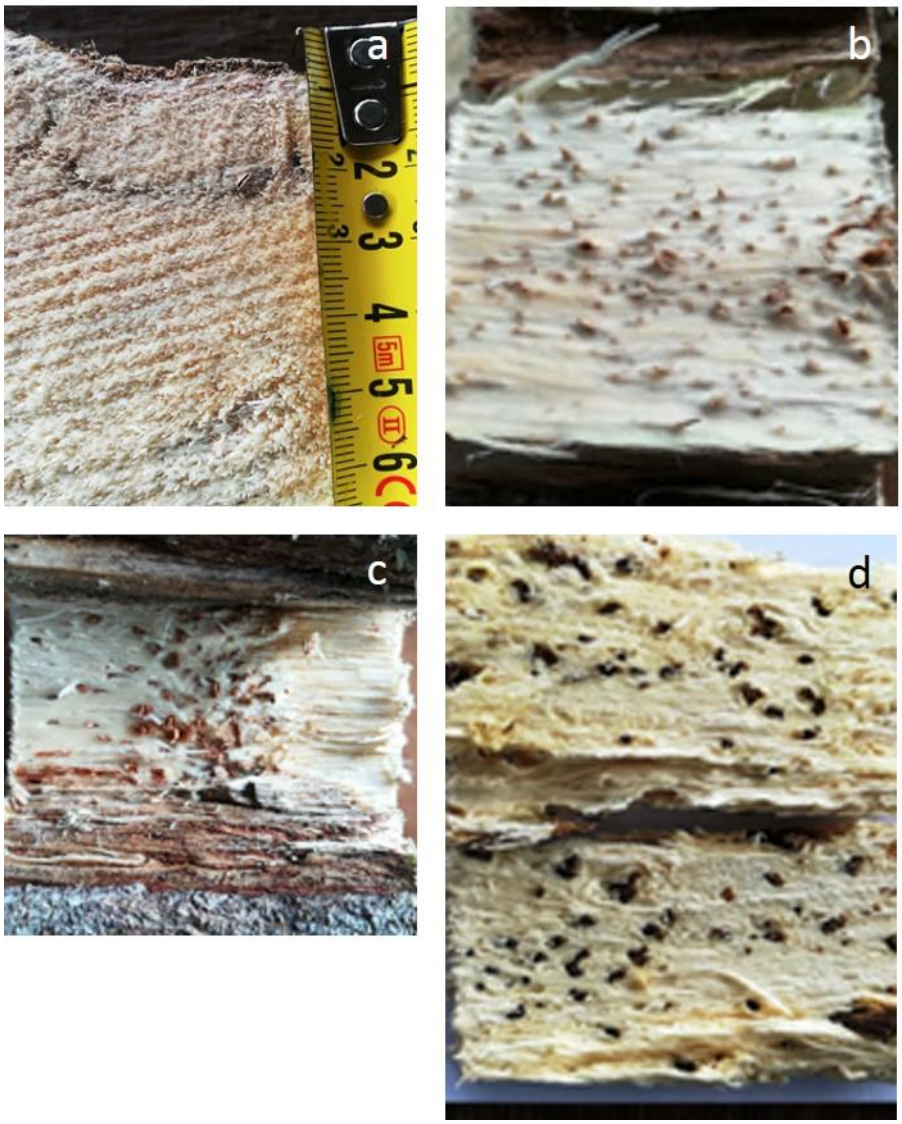

Figure 20 : Réaction d'exsudation après 6 mois (b) et 12 mois (c et d) de branches d'*Aquilaria* stressées avec de la terre (d) et sans terre (b et c).
A 2 cm de profondeur en dessous de l'écorce, on distingue une limite foncée qui représente la limite de l'effet du stress (a). On remarque la présence d'exsudats solidifiés plus ou moins colorés (b, c et d). En d, on remarque la présence d'une fibre foncée, au milieu.

DETECTION RAPIDE DE L'AGARWOOD ET EVALUATION DE SA COMPOSITION CHIMIQUE PAR SPECTROMETRIE PROCHE INFRAROUGE (SPIR)

Clara Zaremski[1], Marc Ducousso[2], Gilles Chaix[1], Nadine Amusant[3]

[1] CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France. AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France. TA A-108 / 1 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France. clara.zaremski@cirad.fr ou clara.zaremski@hotmail.fr & gilles.chaix@cirad.fr

[2] CIRAD - UMR 113, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Cirad/IRD/Inra/Agro-M/UM2 Campus international de Baillarguet - TA A - 82 / J, 34398 Montpellier Cedex 5, France. marc.ducousso@cirad.fr

[3] CIRAD - UMR ECOFOG AgroParisTech, CNRS, INRA, Université des Antilles, Université de Guyane Kourou; BP 701, 97387 Kourou Cedex, French Guiana. nadine.amusant@cirad.fr

RESUME

L'agarwood, connu également sous le nom d'Oud en parfumerie, est un parfum suave et enivrant, rare et précieux. L'agarwood est issu d'une réaction de l'arbre à un stress, généralement une blessure, suivi d'interactions complexes entre le bois modifié par le stress et les cortèges de micro-organismes naturellement présents sur place ou issus d'une inoculation contrôlée. Ces interactions induisent la production de composés secondaires oxydatifs qui confèrent sa couleur noire caractéristique à l'agarwood. Ces composés sont principalement des chromones et des sesquiterpènes, mais diffèrent largement d'une région à l'autre, d'un mode d'induction de la production de l'agarwood à l'autre ; en résulte une large diversité de la qualité d'agarwood. La séparation manuelle de l'agarwood du bois blanc n'est pas toujours aisée et l'appréciation visuelle ou olfactive de la qualité de l'agarwood reste très subjective. Face à ce problème, nous avons testé une approche innovante en vue de différencier des catégories de bois dans les arbres d'*Aquilaria* : la Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR). Ainsi, nous avons analysé les spectres de bois d'*Aquilaria* contaminés par différents types de pourriture en comparaison avec des échantillons non contaminés et avec un témoin de référence d'agarwood provenant du Laos. Les résultats obtenus en SPIR sont cohérents avec les analyses chimiques réalisées précédemment. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de la SPIR pour séparer les copeaux de bois blanc de l'agarwood et pour donner une indication de la composition chimique de l'agarwood. Ainsi, cet outil permet de réunir des agarwood de composition chimique homogène pour l'hydrodistillation et de mieux prédire la composition chimique finale de l'huile essentielle.

MOTS CLES

Aquilaria ; agarwood ; bois blanc ; Guyane ; Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) ; Inoculation contrôlée.

INTRODUCTION

L'agarwood, connu également sous le nom d'Oud, est utilisé en parfumerie depuis plusieurs siècles. Il est utilisé dans des parfums aux notes orientales envoûtantes et est l'apanage du luxe en termes de fragrance. Ce luxe vient notamment de la rareté de ce produit, d'autant plus lorsqu'il est reconnu de haute qualité. En effet, l'agarwood est un bois d'*Aquilaria* ou de *Gyrinops* (Thymeleaeceae) transformé en réaction à un stress, le plus souvent mécanique, et en interaction complexe avec le cortège des micro-organismes naturellement présents dans le bois et dans son environnement proche. Le bois sain d'*Aquilaria* est blanc tandis que l'agarwood, du fait de sa forte teneur en composés secondaires, est noir (Naziz *et al.* 2019). Cette couleur noire de l'agarwood est conférée par sa richesse en molécules aromatiques oxydables qui, au fil du temps, sous les effets des communautés bactériennes et fongiques, le rend plus dense et plus odorant. De l'agarwood sont extraites des huiles essentielles (HE) composées d'environ 150 molécules différentes, notamment des chromones et des sesquiterpènes (Mohamed *et al.* 2010 ; Naef 2011).

En forêt naturelle, le pourcentage d'arbres produisant de l'agarwood est d'environ 10% (Barden *et al.* 2000). Ce pourcentage reste faible, même en plantation. Aussi, le commerce de l'agarwood étant très lucratif, avec le prix des huiles essentielles variant de 5 000 à 10 000 US$ le kg (Barden *et al.* 2000 ; Blanchette *et al.* 2015), cela explique la surexploitation de cette ressource et sa raréfaction dans son milieu naturel. Cette surexploitation a mené la CITES à classer les espèces d'*Aquilaria* en danger critique d'extinction (CITES 2004). Pour faire face à la demande de produits transformés, des espèces d'*Aquilaria,* notamment *A. malaccensis*, *A. crassna* et *A. filaria* (Naziz *et al.* 2019) sont cultivées dans leur région d'origine, principalement en Asie du Sud-Est, et très récemment en Guyane où des plantations pilotes ont été établies (Zaremski 2018). Dans les plantations, pour augmenter la production d'agarwood, les producteurs, par des procédés assez divers, cherchent à induire la réaction des arbres pour obtenir plus d'agarwood. En effet, les rendements en HE de l'agarwood sont jusque dix fois supérieurs à ceux du bois blanc. Même si les HE issues de l'agarwood sont de qualités très variables ; les plus chères en sont issues. Toutefois, le procédé pour induire la production d'agarwood influence directement la composition de l'HE. Il est donc primordial de disposer d'un outil simple et rapide pour trier le bois blanc de

l'agarwood et les différents agarwoods en fonction de leur composition chimique afin d'optimiser la qualité des hydrodistillats.

Parmi les techniques d'analyse des bois, la Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) qui permet, entre autres, de caractériser la durabilité naturelle d'un bois (Niamké *et al.* 2014) ou la composition qualitative et quantitative en HE du bois de Rose ou du Santal (Amusant *et al.* 2016, Kuriakose et Joe 2012) ou encore d'identifier des chémotypes de *Ravensara aromatica* (Chaix *et al.* 2010) a retenu toute notre attention. Ainsi nous avons testé la SPIR sur le bois blanc et sur des agarwood d'*A. crassna* obtenus par différents procédés d'induction, qui sont présentés, dans l'étude « Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction. » (Chapitre 2, Article 1). Dans ce cadre, les spectres obtenus sur le bois blanc et sur les différents agarwoods en fonction des procédés d'induction de l'agarwood ont été comparés aux résultats d'analyses de la composition des HE de ces mêmes agarwoods.

Généralités sur l'analyse en spectrométrie proche infrarouge

Les analyses en spectrométrie proche infrarouge sont fondées sur l'absorption sélective du rayonnement par les composés chimiques de la matière. Il s'agit d'une méthode d'analyses alternative aux méthodes d'analyses classiques, qui est très utilisée dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique. Les longueurs d'ondes du proche infrarouge sont comprises entre 700 et 2 500 nm (Bertrand et Dufour 2006). La spectrométrie proche infrarouge est une méthode indirecte. En effet, elle nécessite une phase de calibration avec des analyses indépendantes complémentaires.

Bien que la spectrométrie proche infra-rouge (SPIR) présente certains **inconvénients**, tel que le chevauchement des bandes spectrales, qui justifie en partie la calibration de l'outil, la SPIR présente certains avantages. En effet, là où les analyses chimiques standards sont coûteuses, chronophages et polluantes, la SPIR est peu chère, rapide et ne nécessite pas de réactifs chimiques (Giordanengo 2004).

Les applications analytiques de la SPIR ont été développées à partir des années 1960, notamment aux Etats-Unis, grâce aux travaux de Karl Norris et de ses collaborateurs (Ben-Gera et Norris 1968 ; Hart *et al.* 1962) sur les céréales, notamment pour déterminer leur teneur en eau. C'est à partir des années 1990 que certains travaux sont effectués sur le bois, notamment afin de prédire la composition chimique du bois et les propriétés physico-mécaniques ou biologiques (Giordanengo 2004). Les avantages majeurs de cette technique d'analyse sur le bois sont son caractère non destructif et la rapidité de l'évaluation de la disponibilité en composés chimiques du bois (cellulose, lignine, extractibles).

Pour de plus amples informations sur la SPIR, on peut se référer à un rapport synthétique et très bien référencé de Giordanengo (2004) et à la deuxième édition d'un ouvrage très précis sur la Spectrométrie proche infra-rouge et ses applications analytiques de Bertrand et Dufour (2006).

MATERIEL & METHODE

Site de l'étude et matériel biologique

Le site de l'étude et le matériel biologique utilisé sont les mêmes que ceux de l'étude « Variabilité de la composition chimique du bois noirci d'*Aquilaria crassna* des plantations de Guyane, en fonction de son mode d'induction. Vers une nouvelle méthode biologique d'induction de l'agarwood ». Il s'agit d'arbres d'*Aquilaria* plantés en Guyane dans le village de Cacao (4° 34' 17" Nord et 52° 28' 11" Ouest), inoculés par des champignons de Guyane : des champignons de pourriture fibreuse : *Coriolopsis polyzona* (CP) ; *Ganoderma resinaceum* (GR) ; *Pycnoporus sanguineus* (PS) ; *Rigidoporus vinctus* (RV) ; *Gloeophyllum trabeum* (GT) ; des champignons de pourriture cubique : *Poria placenta* (PP) ; *Antrodia vaillantii* (AV). Les arbres ont été inoculés par les éprouvettes contaminées ou non, le 11 septembre 2018, par l'introduction de 10 éprouvettes par arbre. Une première série d'arbre – un arbre par modalité – a été abattu le 10 juin 2019 afin d'analyser la réaction de l'arbre 9 mois après l'inoculation. Nous avons complété cette étude en intégrant les mesures d'un bloc de bois blanc issu d'un arbre de la parcelle expérimentale non contaminé, qui joue le rôle de témoin, ainsi que sur un bloc de bois noir d'agarwood provenant du Laos. Au total, 11 échantillons d'agarwood, différants par leur méthode d'induction, ont été comparés.

Préparation du matériel pour les mesures en SPIR

Après abattage des arbres, dix rondelles sont prélevées, le long du tronc, au niveau de chaque zone d'inoculation, puis chacune des rondelles est redécoupée dans le sens longitudinal tangentiel, toujours au niveau de la zone d'inoculation, afin d'observer et de quantifier la réponse de l'arbre. Les mesures en SPIR sont faites directement sur l'agarwood formé en réponse au stress et sur une zone de bois blanc adjacente. Les mesures ont été effectuées directement après la découpe sur deux rondelles pour chaque arbre échantillonné. L'acquisition des spectres en proche infrarouge a été réalisée par réflectance, en utilisant la région PIR de 12 500 cm^{-1} à 3 500 cm^{-1} (800 - 2 850 nm), avec une résolution spectrale de 8 cm^{-1} avec le Spectromètre à transformée de Fourier (MPA, Bruker Optics, Ettlingen, Allemagne). Chaque spectre a été reçu

via 32 balayages en moyenne pour améliorer le rapport signal-bruit et chaque mesure a été réalisée trois fois.

Traitement bio-informatique

Les spetres en proche infrarouge ont été traitées avec le logiciel « The unscrambler® Camo, 2010 » utilisé dans le traitement des données multivariées et fréquemment utilisé pour traiter des données analytiques de mesures en proche infrarouge. Les analyses effectuées ont principalement été des représentations graphiques des spectres et des analyses en composantes principales (ACP) en validation croisée. Ainsi, d'après Bertrand *et al.* (2006), l'utilisation d'ACP est particulièrement adaptée à l'étude exploratoire des données spectrales. En effet, celles-ci donnent une représentation visuelle et synthétique des données.

Après l'essai de différents prétraitements des données spectrales, nous avons choisi d'utiliser la dérivation seconde (Dérivée S Golay) pour nos analyses. En effet, d'après Bertrand et Vigneau (2006), les données spectrales brutes – telles qu'acquises par un spectrophotomètre – peuvent être entachées de défauts liés à la présence de bruits aléatoires ou de déformations de la ligne de base ; elles demandent un prétraitement pour optimiser les traitements ultérieurs.

Pour une présentation plus appropriée de la collection spectrale, l'intervalle du nombre d'ondes est [4000-9000]. Pour la construction des ACP, les données des nombres d'ondes correspondant aux pics de l'eau, c'est-à-dire [5051-5220] U [6954-6974] n'ont pas été incluses dans les calculs, car les mesures sont faites sur bois frais.

RESULTATS

Après l'analyse en SPIR, nous sommes en mesure de fournir un premier modèle spectral du bois blanc et des agarwoods d'*Aquilaria* échantillonnés en Guyane et de bois blanc et d'agarwood en provenance du Laos qui ont été utilisés comme témoins de référence, après dérivation seconde des données brutes (Figure 1). Ces données ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales (Figure 2).

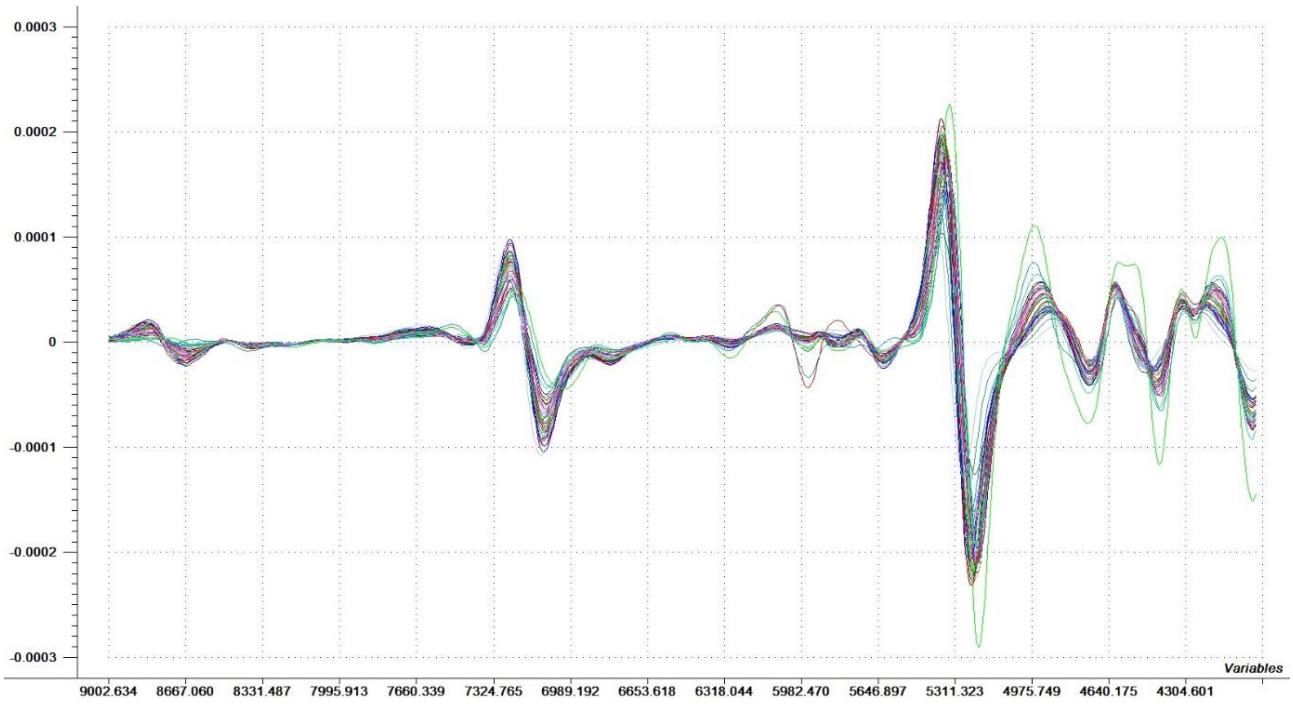

Figure 1 : Présentation de la collection spectrale.
Abscisses : nombre d'ondes, Ordonnées : absorbance (log 1/R). Le spectre esseulé (vert clair —) est le témoin Bois Blanc (NO). La partie comprise entre 9000 et 5000 cm^{-1} est la zone des harmoniques primaires et secondaires. Elle est peu bruitée, informative et servira à déterminer l'étalonnage. La partie entre 5000 et 4000 cm-1 est la zone de combinaison. Elle est peu bruitée et informative mais plus délicate à analyser chimiquement.

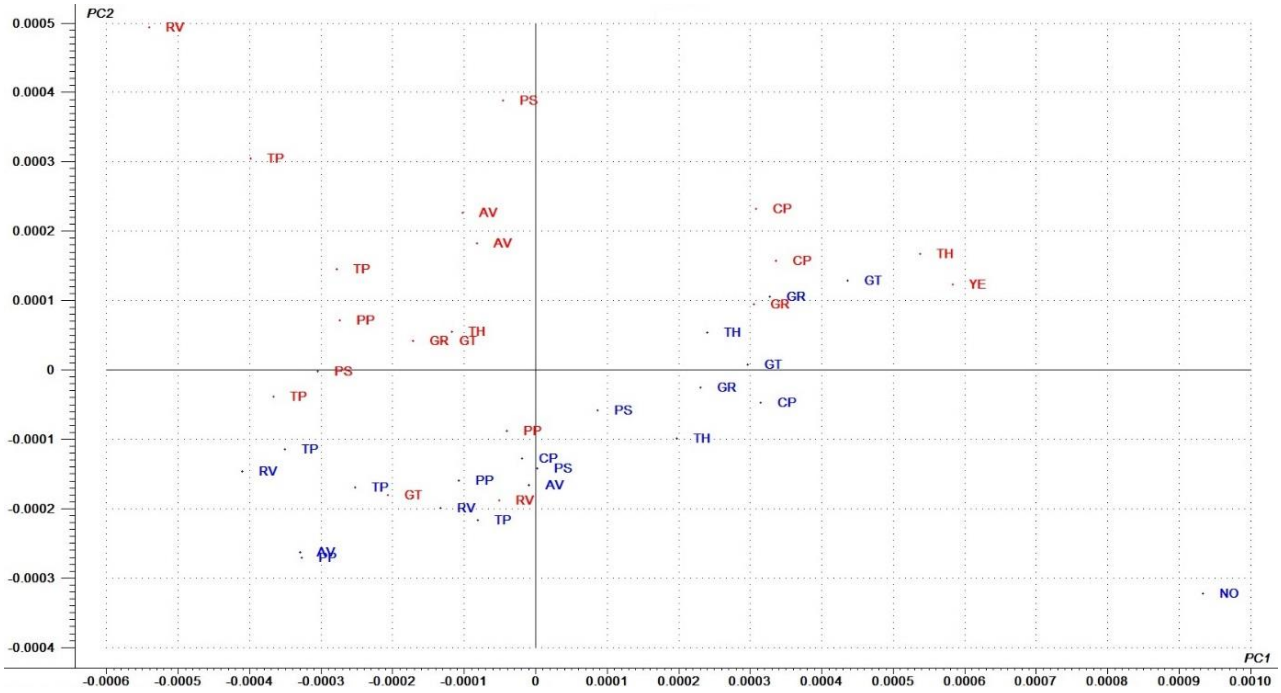

Figure 2 : Analyse en composantes principales (ACP) des spectrogrammes des échantillons contaminés par les différentes souches de champignons et des témoins de bois blanc et de bois noir d'agarwood du Laos. En rouge, les bois noirs, en bleu, le bois blanc.
Le témoin de bois blanc (NO), le témoin de bois noir d'agarwood (YE), les arbres contenant les témoins négatifs Hêtre (TH) et Pin (TP), les arbres inoculés avec le témoin positif *Rigidoporus vinctus* (RV), *les* arbres inoculés avec les champignons de pourriture cubique, *Poria placenta* (PP) et *Antrodia vaillantii* (AV), les arbres inoculés avec les champignons de pourriture fibreuse, *Coriolopsis polyzona* (CP), *Ganoderma resinaceum* (GR), *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Gloeophyllum trabeum* (GT).

Sur l'ACP présentée en Figure 2, on peut voir que l'échantillon témoin de Bois Blanc (NO) se différencie particulièrement de l'ensemble des autres échantillons. L'axe 1 (pourcentage de variance : 69 %) montre un gradient entre les échantillons les plus proches du témoin de l'agarwood du Laos (YE) et les plus éloignés. Ainsi, on remarque que les échantillons les plus proches du témoin agarwood du Laos (YE) sont les échantillons contaminés par les champignons de pourriture fibreuse : *Coriolopsis polyzona* (CP), *Ganoderma resinaceum* (GR), *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Gloeophyllum trabeum* (GT), ainsi que les échantillons contaminés par les témoins Hêtre. Alors que le Témoins Pin (TP), le témoin positif *Rigidoporus vinctus* (RV) et les échantillons contaminés par les champignons de pourriture de cubique, *Poria plancenta* (PP) et *Antrodia vaillantii* (AV) semblent les plus éloignés du témoin agarwood (YE). L'axe 2 (pourcentage de variance : 23 %) montre une différenciation entre les échantillons de bois noir, en rouge, et les échantillons de bois blanc, en bleu.

DISCUSSION

La SPIR, couplée à des analyses statistiques, est régulièrement utilisée pour établir des classes de bois, pour le calibrage (Haartveit et Flæte 2008) ou pour la détermination d'espèces d'arbres (Flæte *et al.* 2006), par exemple.

Les échantillons de bois blanc et de bois noir, sur l'ACP de la figure 2, montrent une différenciation en deux groupes mais qui n'est pas complètement nette. En effet, le seul échantillon de bois blanc qui se différencie particulièrement des autres échantillons est le témoin de Bois Blanc de Guyane (NO), qui n'a subi aucun stress. On peut expliquer ce résultat par la proximité du bois blanc, dans les échantillons mesurés pour l'expérience, avec l'agarwood. Le front de micro-organismes, notamment fongiques, lui conférant progressivement les mêmes caractéristiques physiques et chimiques. Ainsi, ni les caractéristiques chimiques ni l'état de dégradation dû aux champignons ne seraient assez discriminants pour observer une franche différenciation par l'analyse en Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) (Tsuchikawa *et al.* 2003).

Les résultats obtenus en SPIR montrent qu'il est possible de différencier, d'une part le bois blanc de l'agarwood, et d'autre part plusieurs types d'agarwood. On remarque que les agarwoods obtenus grâce aux champignons de pourriture fibreuse sont plus proches de l'agarwood du Laos que ceux obtenus par des champignons de pourriture cubique. En effet, Tsuchikawa *et al.* (2003) ont montré qu'aussi bien les différences de composés chimiques que les différents états de dégradation dûs à des pourritures pouvaient être mis en évidence par les analyses en SPIR couplées aux analyses statistiques multivariées. Or, le principe de notre étude était d'inoculer les arbres d'*Aquilaria* avec différentes souches de champignons pour essayer d'obtenir des agarwoods de compositions chimiques différentes. Cela est montré par nos résultats, où l'on remarque que les agarwoods les plus proches de l'agarwood de référence sont les champignons de pourriture fibreuse et plus particulièrement *Ganoderma resinaceum* et *Gloeophyllum trabeum*. Comme le rappellent Tsuchikawa et Kobori (2015) la SPIR est utilisée dans beaucoup de domaines en sciences du bois, comme l'étude des compositions chimiques du bois, de sa densité, de son anatomie, ou encore l'évaluation de son état de dégradation. Ce sont autant de facteurs qui influent sur l'agarwood. Il

parait donc pertinent d'utiliser la SPIR couplée à des analyses statistiques multivariées pour classer les différents bois issus de la coupe des *Aquilaria*, allant du bois blanc à l'agarwood très concentré.

Ce résultat est à mettre en corrélation avec nos résultats de détermination de composition chimique des mêmes arbres dans l'article intitulé « Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction. » (Chapitre 2, Article 1). En effet, dans cet article, nous avons montré que ce sont les champignons de pourriture fibreuse qui produisent un agarwood dont la composition chimique est la plus proche de l'agarwood de référence et particulièrement *Ganoderma resinaceum* et *Gloeophyllum trabeum*. En effet, l'étude de la composition qualitative et quantitative en huile essentielles, par la SPIR, d'autres genres d'arbres, tels que le bois de Rose et le Santal (Amusant *et al.* 2016, Kuriakose et Joe 2012), ou l'identification des chémotypes de certaines plantes, par exemple de *Ravensara aromatica* (Chaix *et al.* 2010), nous a prouvé que cela est également envisageable sur le bois d'*Aquilaria.*

Ainsi, ces résultats montrent qu'il serait très certainement possible d'utiliser la Spectrométrie Proche Infrarouge dans le cadre d'une différenciation entre l'agarwood et le bois blanc, et aussi pour faire des classes d'agarwood de qualité contrôlée. La classification grâce à la SPIR est déjà utilisée dans plusieurs domaines des sciences du bois, comme le rappellent Tsuchikawa et Kobori (2015). Ainsi, certains auteurs utilisent la SPIR pour différencier l'aubier du bois de cœur (Haartveit et Flæte 2008 ; Yang *et al.* 2012). Ces auteurs insistent également sur la rapidité de la mesure et de l'analyse en SPIR, une fois le calibrage effectué. Cela est particulièrement intéressant pour notre étude et ses perspectives qui viseraient à développer l'utilisation de la SPIR dans l'atelier, pour rendre le tri des différents types de bois, souvent fastidieux et subjectif, plus rapide et plus constant. Cela permettrait aux agriculteurs de ne pas avoir à faire contrôler systématiquement leurs huiles essentielles en analyses chimiques pour en estimer la qualité.

Pour ce faire, il faudra, dans un premier temps, procéder à une nouvelle campagne de mesures, dont le but serait d'établir une collection spectrale d'étalonnage grâce à des échantillons représentatifs, dont les résultats seraient corrélés aux résultats chimiques, qui permettrait, dans un second temps, d'analyser des échantillons inconnus, rapidement et de façon fiable.

CONCLUSION

Cette étude, associée à une autre étude de détermination chimique des composés d'agarwoods obtenus par l'inoculation de différents champignons de pourriture fibreuse ou cubique de Guyane, « Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction. » (Chapitre 2, Article 1), a montré que l'utilisation de Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) est une approche très intéressante et novatrice pour la détection d'agarwood dans le bois d'*Aquilaria*. En effet, les résultats en SPIR et en analyse chimique sont cohérents. Ainsi, la Spectrométrie Proche Infrarouge pourrait être développée comme un outil de contrôle de la composition chimique permettant d'effectuer rapidement un tri en fonction de la composition chimique du bois et de l'agarwood, directement dans l'atelier avant l'hydrodistillation. Cette perspective est d'autant plus intéressante que les analyses en SPIR sont rapides et peu coûteuses.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Projet Aquil@Guyane: Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d' *« Aquilaria* (Agarwood) *»* haut de gamme, et de produits dérivés, en Guyane, co-financé par l'Europe, la Collectivité Territoriale de Guyane et le CIRAD : Fonds de développement régional (FEDER) pour la Guyane française (convention n ° FEDER / 2017 / N ° 31).

Nous tenons à remercier tout particulièrement les agriculteurs Messieurs Ya Hu, Didier Tcha et Pierre Tcha pour leur investissement dans la mise en place et le suivi des parcelles expérimentales et pour leur disponibilité sans faille lorsqu'il s'agit de nous assister lors des prélèvements en champs.

Nous remercions très chaleureusement nos collègues Dr. Alba Zaremski, Dr. Jacques Beauchêne, Dr. Georges Michaloud, Dr. Deborah Fernand, Pr Claude Andary, Messieurs Soepe Koese, Julien Passelande et Arnaud Jahn-Oyak pour leurs contributions à cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amusant N, Beauchène J, Digeon A, Chaix G (2016) Essential oil yield in Rosewood (*Aniba Rosaeodora* Ducke): Initial application of rapid prediction by Near Infrared Spectroscopy based on wood spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 24: 507–515. https://doi.org/10.1255/jnirs.1241

Barden A, Anak NA, Mulliken T, Song M (2000) Heart of the matter: agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis*. Traffic network report, *TRAFFIC International*, Cambridge, 60 p. Url: http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Traf-072.pdf

Ben-Gera I, Norris KH (1968) Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *Journal of Food Science* 33: 64 – 67. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00885.x

Bertrand D, Courcoux P, Qannari EM (2006) Méthodes exploratoires. In : La spectrométrie infrarouge et ses applications analytiques. Eds Lavoisier. Paris, France, p. 317-345

Bertrand D, Dufour E (2006) La spectrométrie infrarouge et ses applications analytiques. Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires. Eds Lavoisier. Paris, France, 660 p

Bertrand D, Vigneau E (2006) Prétraitement des données spectrales. In : La spectrométrie infrarouge et ses applications analytiques. Eds Lavoisier. Paris, France, p. 427-447

Blanchette RA, Jurgens JA, Heuveling van Beek H (2015) Growing ***Aquilaria*** and production of agarwood in hill agro-ecosystems. In: *Integrated Land Use Management in the Eastern Himalayas*. Eds K. Eckman and L. Ralte. Delhi, India, p. 66-82

Chaix G, Andrianoelisoa H, Menut C, Danthu P (2010) Identification des chémotypes de *Ravensara aromatica* par spectrométrie proche infrarouge. *Communication de congrès* : *29èmes journées internationales huiles essentielles et extraits*. 24 & 25 Juin 2010. Digne les Bains, France

Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), 2004. "Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Consideration of proposals for amendment of appendices-I and –II *Aquilaria* spp. and *Gyrinops* spp.". In: *Proceedings of the Thirteen Meeting of the Conference of the Parties*, Bangkok, Thailand, October 2 to 14, 2004

Flæte PO, Haartveit EY, Vadla K (2006) Near infrared spectroscopy with multivariate statistical modelling as a tool for differentiation of wood from tree species with similar appearance. *New Zealand Journal of Forestry Science* 36(2/3): 382-392.

Giordanengo T (2004) Analyse de la variabilité génétique de quatre propriétés chimiques du bois d'hybrides d'*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* par utilisation de la Spéctrométrie Proche Infra Rouge. *Rapport de stage Cirad, Enstib*, 105 p

Haartveit EY, Flæte PO (2008) Near Infrared Spectroscopy (NIRS) as a Tool for Effective Classification of Wood. Proceedings of the 51st International Convention of Society of Wood Science and Technology November 10-12, 2008 Concepción, CHILE Paper WS-25: 1-9

Hart JR, Norris KH, Golumbic C (1962) Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanol extracts. *Cereal Chemistry* 39: 94-99

Kuriakose S, Joe H (2012) Qualitative and quantitative analysis in sandalwood oils using near infrared spectroscopy combined with chemometric techniques. *Food Chemistry* 135(1): 213–218, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.073

Mohamed R, Jong PL, Zali MS (2010) Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Diversity* 43: 67-74

Naef R (2011) The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review. *Flavour and Fragrance Journal* 26(2): 73–87, doi: 10.1002/ffj.2034

Naziz PS, Das R, Sen S (2019) The scent of stress: evidence from the unique fragrance of agarwood. *Frontiers in Plant Science* 10:840, doi: 10.3389/fpls.2019.00840

Niamké FB, Amusant N, Kadio AA, Thevenon M-F, Nourissier S, Adima AA, Jay-Allemand C, Chaix G (2014) Rapid prediction of phenolic compounds as chemical markers for the natural durability of Teak (*Tectona Grandis* Linn f.) heartwood by Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 22: 35-43. https://doi.org/10.1255/jnirs.1091

Tsuchikawa S, Inoue K, Noma J, Hayashi K (2003) Application of near-infrared spectroscopy to wood discrimination. *Journal of Wood Science* 49 (1): 29-35. https://doi.org/10.1007/s100860300005

Tsuchikawa S, Kobori H (2015) A review of recent application of near infrared spectroscopyto wood science and technology. *Journal of Wood Science* 61 (1): 213-220. https://doi.org/10.1007/s10086-015-1467-x

Yang Z, Lu B, Huang AM, Liu YN, Xie XQ (2012) Rapid identification of softwood and hardwood by near infrared spectroscopy of cross-sectional surfaces. *Spectroscopy and Spectral Analysis* 32: 1785–1789

Zaremski A (2018) Rapport d'exécution Intermédiaire du 1er janvier 2017 au 31 décembre 2018. Le projet Aquil@Guyane: "Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'*Aquilaria* (Agarwood) " haut de gamme et de produits dérivés, en Guyane. *Agritrop CIRAD*, Kourou, 24 p

CHAPITRE 3 : PEUT-ON ENVISAGER DE PRODUIRE DE L'AGARWOOD EN LABORATOIRE A PARTIR DE CALS D'*AQUILARIA CRASSNA* ?

Introduction du Chapitre 3

Objectif

L'objectif de ce chapitre est de mettre en place des méthodes d'études en laboratoire pour comprendre les mécanismes cellulaires de la production d'agarwood par *Aquilaria*. Ainsi, après avoir élaboré un protocole de production de cals d'*A. crassna*, une étude histologique à partir de la coloration combinée Acide Périodique-Schiff et Naphtol-Blue-Black pour différencier les cellules des autres composants et une coloration avec le réactif de NaDi pour colorer les terpènes a été développées pour mettre en évidence la production d'huiles essentielles dans les cals colonisés par les souches de champignons séléctionnées.

Résultats principaux

L'approche histologique à partir de techniques de coloration classique a permis de mettre en évidence des colonisations dépendantes de la souche de champignon, avec notamment une colonisation de la totalité du cal par *Gloeophyllum trabeum*. De plus, la mise en évidence de colonisations des cals par les champignons et la présence de sécrétions concomitantes pourraient révéler un mécanisme de réaction des cals à l'invasion par le champignon. La coloration au réactif de NaDi a mis en évidence la présence de terpènes, composés caractéristiques des huiles essentielles et des résines, particulièrement présents dans l'agarwood, et ce de façon préférentielle dans le cal contaminé avec la souche de *Pycnoporus sanguineus*.

Conséquences pour l'itinéraire technique

Au contact des souches de champignons sélectionnées, les cals d'*Aquilaria* produisent des sécrétions, notamment terpéniques. Les terpènes, plus particulièrement les sesquiterpènes, sont caractéristiques de l'agarwood. Cette étude permet donc d'envisager une production d'agarwood en laboratoire, après le développement des techniques d'induction. Le développement de cette technique peut permettre d'étudier l'expression des génomes d'*Aquilaria* et du champignon inoculé lors de leur interaction, cela afin de mieux comprendre les mécanismes de formation de l'agarwood.

ETUDE HISTOLOGIQUE DES CALS D'*AQUILARIA CRASSNA* COLONISES PAR LES CHAMPIGNONS LIGNIVORES *PYCNOPORUS SANGUINEUS*, *GLOEOPHYLLUM TRABEUM* ET *ANTRODIA VAILLANTII*.

Clara Zaremski[1], Nadine Amusant[2], Claude Andary[3], Christine Sanier[1], Maurane Dolly[1], Pascal Ilbert[4], Axel Labeyrie[4], Fabienne Morcillo[4], Marc Ducousso[5]

[1] CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France. AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France. TA A-108 / 1 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

[2] CIRAD - UMR ECOFOG AgroParisTech, CNRS, INRA, Université des Antilles, Université de Guyane Kourou; BP 701, 97387 Kourou Cedex, French Guiana.

[3] Retired from Faculty of Pharmacy, University of Montpellier and from CEFE, UMR 5175, CNRS, Montpellier, France / 17 rue des Millepertuis, 34830 Clapiers, France.

[4] CIRAD – UMR DIADE – Centre IRD – BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5.

[5] CIRAD - UMR 113, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Cirad/IRD/Inra/Agro-M/UM2 Campus international de Baillarguet - TA A - 82 / J, 34398

RESUME

Les arbres du genre *Aquilaria* présentent un grand intérêt, en particulier pour le marché de la parfumerie, par le bois modifié, l'agarwood, qu'ils produisent en interaction complexe avec des micro-organismes. Cet agarwood de couleur noirâtre est rare, prisé, et possède une très haute valeur ajoutée sur le marché international. En effet, les huiles essentielles et l'oléorésine qui en sont extraites sont, notamment, utilisées en parfumerie de luxe. La surexploitation a mis en péril *Aquilaria*, qui est en danger critique d'extinction. Fort de ces constats, nous avons développé un essai de contamination contrôlée de cals issus de feuilles d'*Aquilaria crassna* par des souches de champignons de Guyane, sélectionnées pour leur caractère lignivore : *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* et *Antrodia vaillantii*. Ainsi, nous avons pu constater qu'après deux mois de mise en contact des cals avec les champignons, ils sont colonisés et commencent à produire des sécrétions qui pourraient être de l'agarwood. Le développement de cette technique permet d'envisager la compréhension du fonctionnement génomique d'*Aquilaria* et de son interaction contrôlée avec un champignon lignivore lors de la synthèse d'agarwood.

MOTS CLES

Agarwood, *Antrodia vaillantii, Aquilaria*, cals, champignon, *Gloeophyllum trabeum*, Guyane, histochimie, hyphes, *Pycnoporus sanguineus,* Terpènes.

INTRODUCTION

Le genre *Aquilaria* est particulièrement connu pour le bois transformé qu'il produit quand celui-ci, une fois blessé, est en interaction avec des micro-organismes. En effet, cette interaction complexe avec des micro-organismes, notamment fongiques, aboutit à la production d'un bois transformé caractérisé par sa forte teneur en composés secondaires, apparus en réaction au stress dû à l'agression (Naziz *et al.* 2019). Ce bois transformé, ou agarwood, est riche en molécules aromatiques, oxydables pour la plupart, à l'origine de sa couleur noire, et présente une forte teneur en oléorésines et en huiles essentielles, composées d'environ cent cinquante molécules (Naef 2011), comprenant des molécules volatiles hydrodistillables et des molécules non distillables, mais qui peuvent être extraites par des solvants polaires (acétone, méthanol, eau ...). Ces extraits, ainsi que l'huile hydrodistillable, obtenus à partir de l'agarwood, forment un mélange complexe composé de différents groupes de structures chimiques, essentiellement des sesquiterpènes tels que : Agarospirol, ß-Agarofuran, 10-epi-ɣ-Eudesmol, Guaiol, Jinkoh-eremol (Naef 2011 ; Tan *et al.* 2019). Selon plusieurs auteurs (Soehartono et Mardiastuti 1997 ; Mohamed *et al.* 2010 ; Zaremski *et al.* 2018), les genres de champignons qui colonisent les espèces du genre *Aquilaria* sont *Aspergillus, Arthrinium, Botryodyplodia, Diplodia, Dokmaia, Fusarium, Penicillium* et *Trichoderma*. D'après Mohamed *et al.* (2014). La production d'agarwood est induite lors de blessures de l'arbre d'*Aquilaria*. Puis, les cortèges de champignons qui infectent l'arbre à la suite de cette blessure prolongent cette production.

Le nombre d'arbres qui produisent de l'agarwood est environ de 10% en milieu naturel (Barden *et al.* 2000) et le pourcentage d'arbres qui en produisent en plantations est relativement faible. Par exemple, dans certaines plantations d'Inde, il est inférieur à 33% (Kalita *et al.* 2015). Le fait que le commerce de l'agarwood soit lucratif, avec le prix du kilogramme d'huile essentielle variant principalement entre 5.000 et 10.000 US$ (Barden *et al.* 2000 ; Blanchette *et al.* 2015), explique que la ressource ait été progressivement épuisée dans son milieu naturel. Aussi certaines espèces d'*Aquilaria,* principalement *A. malaccensis*, *A. crassna* et *A. filaria* (Naziz *et al.* 2019), sont cultivées, notamment en Chine, en Thaïlande, en Inde, en Malaisie et dans d'autres pays d'Asie du Sud-Est. Une autre alternative pourrait être le développement d'agarwood en conditions contrôlées au laboratoire. Ainsi, certaines études mettent en

avant que la culture de cals d'*Aquilaria* spp. (Saikia *et al.* 2012) peut être une alternative pour produire les composés caractéristiques de l'agarwood (Okudera et Ito 2009).

Alors que l'influence d'un grand nombre de champignons sur la production d'agarwood par les arbres du genre *Aquilaria* a été démontrée, leur capacité d'induction de la production d'agarwood sur les cals n'a, à ce jour, pas été testée. Nous avons donc mis en place cette étude qui vise à démontrer que l'inoculation de cals d'*A. crassna* par des souches connues de champignon de Guyane peut induire la production d'agarwood et par la même occasion de résines ou d'huiles essentielles, à partir d'une approche histologique. Ainsi, après avoir élaboré un protocole de production de cals d'*A. crassna* en milieu solide et liquide (Morcillo *et al.* 2018), une étude histologique a été menée à partir de deux types de coloration : d'une part, la coloration combinée entre l'Acide Périodique-Schiff et le Naphtol-Blue-Black pour différencier les cellules des autres composants et d'autre part, la coloration avec le réactif de NaDi pour colorer les terpènes et évaluer la présence d'huiles essentielles dans les cals colonisés par les souches de champignons ciblées. Il est à noter que le développement de cette technique peut permettre d'étudier l'expression des génomes d'*Aquilaria* et du champignon inoculé lors de leur interaction, cela afin de mieux comprendre les mécanismes de formation de l'agarwood.

MATERIEL ET METHODE

Mise au point de la méthode de production de cals à partir de feuilles d'*A. crassna*

La mise au point de la technique de production de cals a été réalisée au Laboratoire de culture *in vitro* à l'IRD de Montpellier par des membres de l'Equipe Palmier F2F, spécialisée dans ce domaine d'activité. Cette technique est confidentielle (Morcillo *et al.* 2018) et ne sera pas détaillée ici.

Matériel végétal

Des feuilles de l'espèce *A. crassna* ont été prélevées sur 10 plants âgés de 6 mois (identifiés de 1 à 10 ; Dolly 2019), issus des plantations de Cacao en Guyane et cultivés dans les serres tropicales du Cirad. Une feuille ou deux, selon leur taille, ont été prélevées sur la partie apicale de chaque plante. Chaque feuille a été prélevée à l'aide de ciseaux en coupant le pétiole, puis placée dans un Erlenmeyer d'eau stérile afin d'éviter le dessèchement lors du transport.

Production de cals

La production des cals a été faite à partir d'explants foliaires selon la technique de callogénèse-DIADE (Morcillo *et al.* 2018 ; Figure 1) en milieu solide et liquide. Le temps de réaction des explants a été relativement rapide, des cals blanchâtres ont pu être observés après 4 à 10 semaines de culture (Figure 1) quel que soit l'explant foliaire mis en culture. Ainsi, le génotype, la taille de la feuille ou la position transversale de l'explant foliaire n'ont pas eu d'influence sur la production de cals. Après quatre mois de culture, les cals issus de milieu solide et liquide ont été conservés au laboratoire pour des études sur les caractéristiques microscopiques des espèces fongiques associées à la production d'agarwood.

Figure 1 : Production et multiplication de cals d'*Aquilaria* à partir d'explants foliaires.
La callogénèse progresse sur les explants foliaires au niveau des zones de section des feuilles (à gauche) jusqu'à recouvrir la totalité des explants (à droite).

Développement mycélien dans les cals d'*A. crassna*

Afin de tester la capacité des espèces fongiques à stimuler la production d'oléorésine dans les cals, trois étapes ont été nécessaires pour préparer l'inoculum à introduire avec les cals. La première étape a été d'identifier et de choisir les champignons d'intérêt pour l'étude, parmi les champignons récoltés en Guyane. La deuxième étape a été de produire du mycélium pur à partir de la culture des champignons récoltés. La troisième étape a été de procéder au développement du champignon avec les cals. Ces cals, ainsi co-cultivés avec le mycélium pur de champignons sélectionnés, ont servi à l'étude histologique.

Etape 1 : Identification et choix des champignons pour l'étude

Des champignons ont été récoltés à l'état frais, dans des sites forestiers situés près de Cacao et Régina, deux communes de l'est de la Guyane proches des sites expérimentaux. Ces champignons ont été récoltés sur du bois mort au sol (25 champignons) et sur des arbres morts sur pied (14 champignons ; Figure 2). Nous avons réalisé une étude taxonomique basée sur des séquences de la petite sous-unité (SSU) d'ADN ribosomique (r) utilisant les deux paires d'amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R, sur ces 39 fructifications de champignons (Zaremski *et al.* 2019). Cette étude a permis de préciser par BlastN l'identité des 39 échantillons récoltés qui appartiennent aux genres *Antrodia, Coriolopsis, Fomitopsis, Ganoderma, Poria, Lentinus, Pycnoporus, Auricularia, Gloeophyllum, Trametes, Fomitopsis* et *Rigidoporus*.

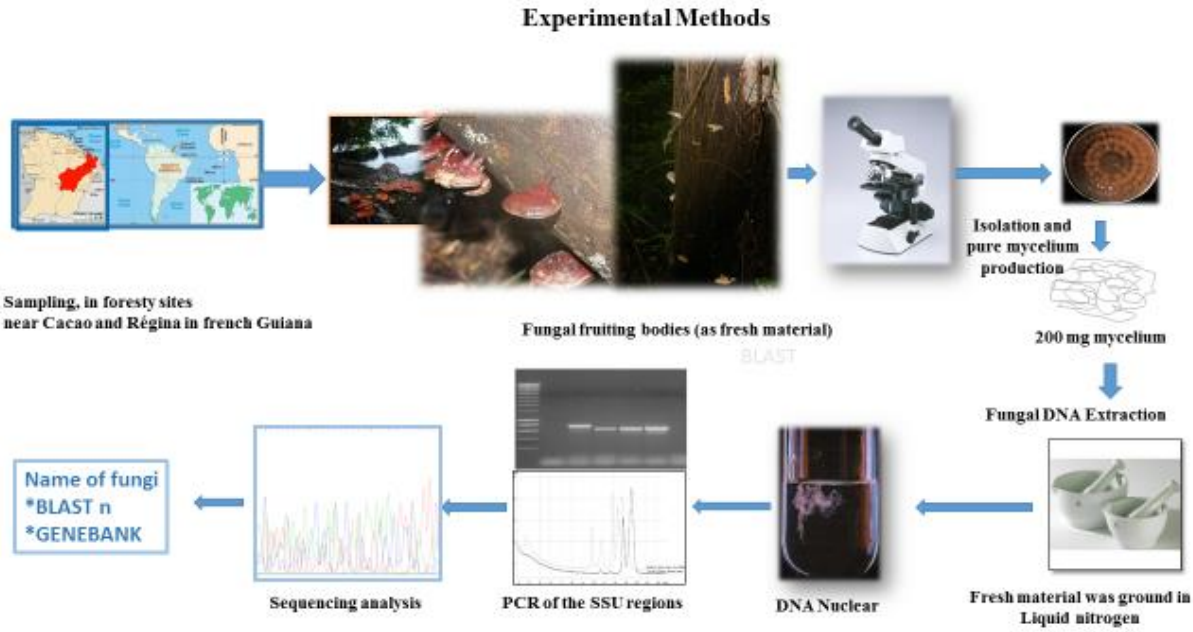

Figure 2 : Les étapes nécessaires à la caractérisation moléculaire des champignons étudiés.

Une fois les souches de champignons caractérisées, la production de mycélium pur à partir des fructifications identifiées dans cette étude a été utilisée pour produire de l'inoculum afin de tester la capacité de ces espèces fongiques à stimuler la production d'oléorésine sur des arbres *Aquilaria* de plantations établies en Guyane. Parmi les champignons cultivés en souche pure nous avons choisi 2 champignons de pourriture fibreuse (PF) et 1 de pourriture cubique (PC). Ces champignons ont été choisis car ils sont fréquemment rencontrés en Guyane, donc aisément disponibles, et sont très facilement cultivables en laboratoire. Les champignons choisis pour l'étude figurent ci-dessous :

- S'agissant des champignons de pourriture fibreuse : *Pycnoporus sanguineus* (PS) ; *Gloeophyllum trabeum* (GT). Le GT peut se comporter aussi bien comme un champignon de pourriture cubique que comme un champignon de pourriture fibreuse (Zaremski 2005). Si en biotope continental il se comporte plutôt en champignon de pourriture cubique, notamment en dégradant les gymnospermes, en biotope tropical humide, il se comporte comme un champignon de pourriture fibreuse.
- S'agissant du champignon de pourriture cubique : *Antrodia vaillantii* (AV).

Champignons de pourriture fibreuse et cubique, d'après Fougerousse (1979)

Parmi les champignons, ceux qui s'attaquent au bois le font en dégradant soit la lignine, la cellulose ou les deux à la fois et sont nommés lignivores (qui mangent le bois) ou lignicoles (qui vivent dans le bois) du latin *« lignum »*, bois. Ces champignons peuvent être spécialisés en étant assujettis, soit à des espèces résineuses, à des espèces feuillues, voire aux deux à la fois. Ces champignons appartiennent à deux grands groupes, selon leur spécificité à dégrader le bois : un groupe qui engendre une pourriture colorée ou cubique et un autre groupe qui engendre une pourriture blanche ou fibreuse. Les agents de pourritures cubiques sont destructeurs de la cellulose mais peu dommageables pour la lignine, ce qui entraîne une coloration plus foncée du bois. Le processus de dégradation du bois par les pourritures fibreuses est plus complexe car tous les constituants des membranes ligneuses peuvent être détruits. Souvent ce processus de dégradation débute par la dégradation de la lignine et se poursuit par la dégradation de tous les constituants du bois dans un ordre variable suivant les champignons.

Etape 2 : Production de mycélium pur des champignons d'intérêt.

La collecte des sporophores frais sur les sites proches des différentes plantations, a été suivie par une conservation à 4°C et un dépôt au laboratoire de phytopathologie de Montpellier, où se sont déroulées les étapes de mise en culture et de purification des isolats (Figure 3).

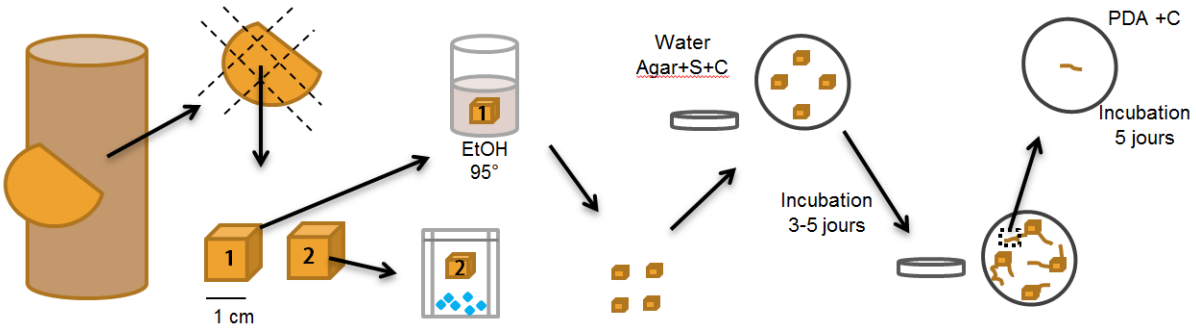

Figure 3 : Les différentes phases de purification d'un isolat issu d'un sporophore frais.

Les sporophores ont premièrement été nettoyés à l'eau distillée avec l'aide d'une brosse, pour éliminer les débris végétaux et les éventuels contaminants. Ils ont été ensuite séchés à l'aide de papier absorbant, puis les parties externes du sporophore ainsi que l'hyménium ont été éliminés à l'aide d'un couteau et d'un scalpel stérilisés. Après cette étape de préparation du sporophore, le cube d'hyménophore ainsi obtenu est brièvement immergé dans de l'éthanol à 96° sous une hotte à flux laminaire pour désinfecter l'échantillon, puis il est déposé dans une boite de Pétri stérile sous la hotte quelques minutes pour permettre à l'alcool de s'évaporer. Les parties externes du cube sont encore une fois éliminées à l'aide d'un scalpel stérile afin d'obtenir un fragment d'environ $1cm^3$ placé au centre de la boite de Pétri contenant le milieu de culture malt-agar (Malt 4 % et Agar 2 %). Les cultures ont été incubées à 28°C dans une enceinte climatique : obscure, régulée à une température de 22 ± 2°C et à une humidité relative HR = 70 ± 5% pour stimuler la croissance du mycélium. Ces cultures ont été observées quotidiennement jusqu'à la colonisation complète de la surface de la boîte de Pétri.

Pour chaque souche testée, nous avons préparé 5 boites de Pétri destinées à la mise en place de l'essai mais aussi à leur conservation au sein de la collection fongique de la mycothèque.

Durant 20 jours de mise en culture, nous avons vérifié l'absence de contamination de la culture et son développement dans la boîte de Pétri. Les boites de Pétri présentant une contamination ou un mauvais développement sont éliminées.

Etape 3 : Développement du champignon dans les cals

Pour le développement du champignon dans les cals, une fois la plage de culture de la boîte de Pétri entièrement recouverte par le mycélium du champignon, celui-ci est introduit aseptiquement dans les Erlenmeyers contenant les cals, sous hotte à flux laminaire, qui sont ensuite puis placés à l'obscurité, en enceinte climatique régulée à une température de 22 ± 2°C et à une humidité relative HR = 70 ± 5%, pendant une durée de deux mois (Figure 4).

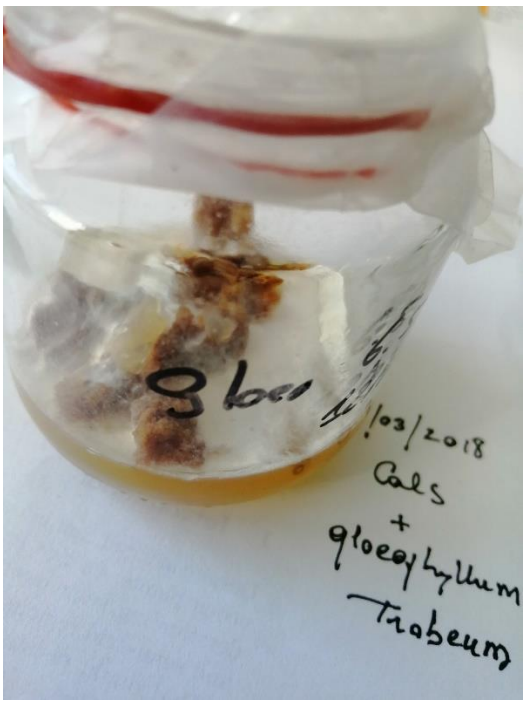

Figure 4 : Mise en culture de cals d'*Aquilaria crassna* avec la souche de *Gloeophyllum trabeum*.

Durant ces deux mois, nous vérifions l'absence de contamination bactérienne de la culture sur et dans les cals ainsi que leur développement. Les Erlenmeyers présentant une contamination ou un mauvais développement sont éliminées.

Le développement du champignon dans les cals nous permet de procéder à l'étude histologique sur trois cals en milieu solide, un par souche de champignon ayant servi à l'inoculation : *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Gloeophyllum trabeum* (GT), *Antrodia vaillantii* (AV) et un témoin non-inoculé ; soit un total de 4 cals observés.

Etude histologique

Cette étude a pour objectif de visualiser la propagation des hyphes des champignons dans les cals et de rechercher la présence éventuelle de terpènes, caractéristiques des oléorésines et des huiles essentielles, qui auraient été sécrétées par les cals colonisés. Cette étude a été réalisée dans le laboratoire de l'équipe PHIV du CIRAD Montpellier, selon leurs modes opératoires.

Fixation au glutaraldéhyde paraformaldéhyde caféine

Cette étape permet de figer les cellules dans un état proche de celui où elles se trouvaient au moment de l'analyse. Cela permet de bloquer les systèmes enzymatiques

afin d'éviter toute modification structurelle ultérieure de l'échantillon. Les aldéhydes contenus dans le fixateur agissent en formant des ponts covalents entre deux parties d'une même protéine, ou de deux protéines différentes, ce qui a pour conséquence le durcissement des tissus nécessaires à la coupe ultérieure.

Selon Buffard-Morel *et al.* (1992), les cals sont enrobés dans de l'agarose 5% afin de faciliter leur manipulation durant les différents bains et la réalisation des coupes. Après solidification et découpe en petits dés de l'agarose contenant les cals, les échantillons sont placés dans le fixateur Glutaraldéhyde 1 % Paraformaldéhyde 2 % Caféine 1 % Tampon phosphate sodium 0.1 M pH 7 pendant 24h sous vide séquentiel.

Afin de les déshydrater progressivement et de mieux conserver les échantillons, une déshydratation est effectuée dans des bains d'alcool de concentration croissante (30 %, 50 %, 70 %). S'ensuit l'utilisation de l'histoprocesseur HISTOS 5 qui permet de traiter rapidement les échantillons à l'aide de micro-ondes (avec contrôle de la température) pour une meilleure pénétration des solutions : bains successifs d'alcool 70 %, 95 %, 100 %, de butanol 100 % puis de résine glycolméthacrylate.

Inclusion en résine diméthacrylate glycidique de bisphénol A

Cette dernière étape de préparation avant la coupe permet d'obtenir un bloc de résine durcie contenant les échantillons. On immerge les échantillons dans un moule contenant de la résine de glycolméthacrylate. La réaction étant exothermique on dispose les moules dans un bac de glace. Après polymérisation de la résine les inclusions sont placées à 37°C.

Coloration combinée Acide Périodique-Schiff (PAS) et Naphthol-Blue-Black (NBB)

Une fois la coupe effectuée au microtome Leica RM2255 (4 µm d'épaisseur), celle-ci est colorée afin de mieux différencier les cellules des autres composants. Il s'agit d'une réaction histochimique due à l'action combinée de l'acide Périodique-Schiff (PAS ; Sigma-Aldrich, Lyon, France) et du Naphthol Blue-Black (NBB ; Sigma-Aldrich). Chaque section a été doublement colorée selon Buffard-Morel *et al.* (1992) et Fisher (1968) ; ce traitement colore en rose les parois et les réserves amylacées (par PAS), et en bleu/noir les nucléoles, noyaux, et réserves protéiques (par NBB). Une fois cette coloration réalisée, on observe au microscope optique Nikon Eclipse Ni-E.

Coloration par le réactif de NaDi

Il s'agit d'une coloration extemporanée visant à colorer les terpènes, composants des huiles essentielles et résines, en bleu. Cette coloration a été mise au point par les agents de la plateforme PHIV du Cirad Montpellier d'après la thèse de Jana Machenaud (2012) en références à David et Carde (1964). C'est un point très important de notre étude étant donné que l'agarwood produit par les *Aquilaria* est exploité pour l'oléorésine et les huiles essentielles qui le constituent.

Cette coloration est un mélange de 1-naphthol et de N-N-diméthyl-p-phénylène diamine : mélange extemporané d'une solution alcoolique d'α-naphtol 1 % (m/v) dans de l'éthanol à 40 % et d'une solution aqueuse de N-N-diméthyl-p-phénylènediamine-dihydrochloride 1 % (m/v) dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,2 (0,5/0,5/49 ; v/v/v).

Le cal *Aquilaria* est placé dans le réactif de NaDi pendant 30 à 60 minutes à l'obscurité et observé en microscopie optique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Grâce à la coloration combinée de l'acide Périodique-Schiff et du Naphthol-Blue-Black, on peut mettre en évidence les structures d'un cal sain (Figure 5b) en comparaison avec celles de cals colonisés par les trois souches de champignons : PS (Figure 6b), GT (Figure 7b) et AV (Figure 8b).

Après la coupe des cals et la coloration combinée de l'acide Périodique-Schiff et du Naphthol-Blue-Black on remarque que le tissu est organisé en cellules de forme plutôt anguleuse (Figure 5b). Dans les cals contaminés par les champignons, les hyphes mycéliens se propagent de façon assez homogène dans les cals qu'elles colonisent (Figure 6b, 7b, 8b). Ils sont particulièrement présents dans le cal inoculé par la souche de GT (Figure 7b), mis en évidence sur l'ensemble de la figure, qu'ils soient en amas ou épars. En revanche, ils semblent localisés autour de certaines cellules dans le cal inoculé par la souche de PS (Figure 6b). Les hyphes se distinguent également bien dans le cal colonisé par AV (Figure 8b).

Il est à noter que l'utilisation de la coloration à l'acide Périodique-Schiff est reconnue depuis les années 50 comme outil fiable de reconnaissance de la présence de champignons dans les tissus animaux et végétaux (Dring 1955 ; Starr *et al.* 1955) et la coloration combinée avec le Naphtol Blue Black augmente le contraste (Fisher 1968).

Sur ces figures, il semble que la lamelle moyenne des cellules des cals commence à être digérée : les cellules sont plus rondes et moins organisées que celles du cal sain (Figure 5b). Les cellules sont altérées par les champignons qui libèrent les tensions et provoquent l'arrondissement des cellules. Sur la Figure 7b, on remarque des amas de couleur rose qui peuvent être des accumulations de paroi des cellules mortes. Sur cette même figure, qui montre un cal colonisé par GT, on distingue également la présence de sécrétions, de couleur bleu-vert, dont on ne connaît pas la nature exacte et qui parait coexister avec la présence des champignons. D'après Cui *et al.* (2013), ces sécrétions seraient produites en réponse à la contamination du champignon et permettraient de diminuer leur croissance. Ces auteurs rapportent que l'hôte empêche le tissu contenant les sécrétions de résister à l'invasion fongique pour protéger les tissus sains. Ces auteurs les ont nommées « *self-injury* ».

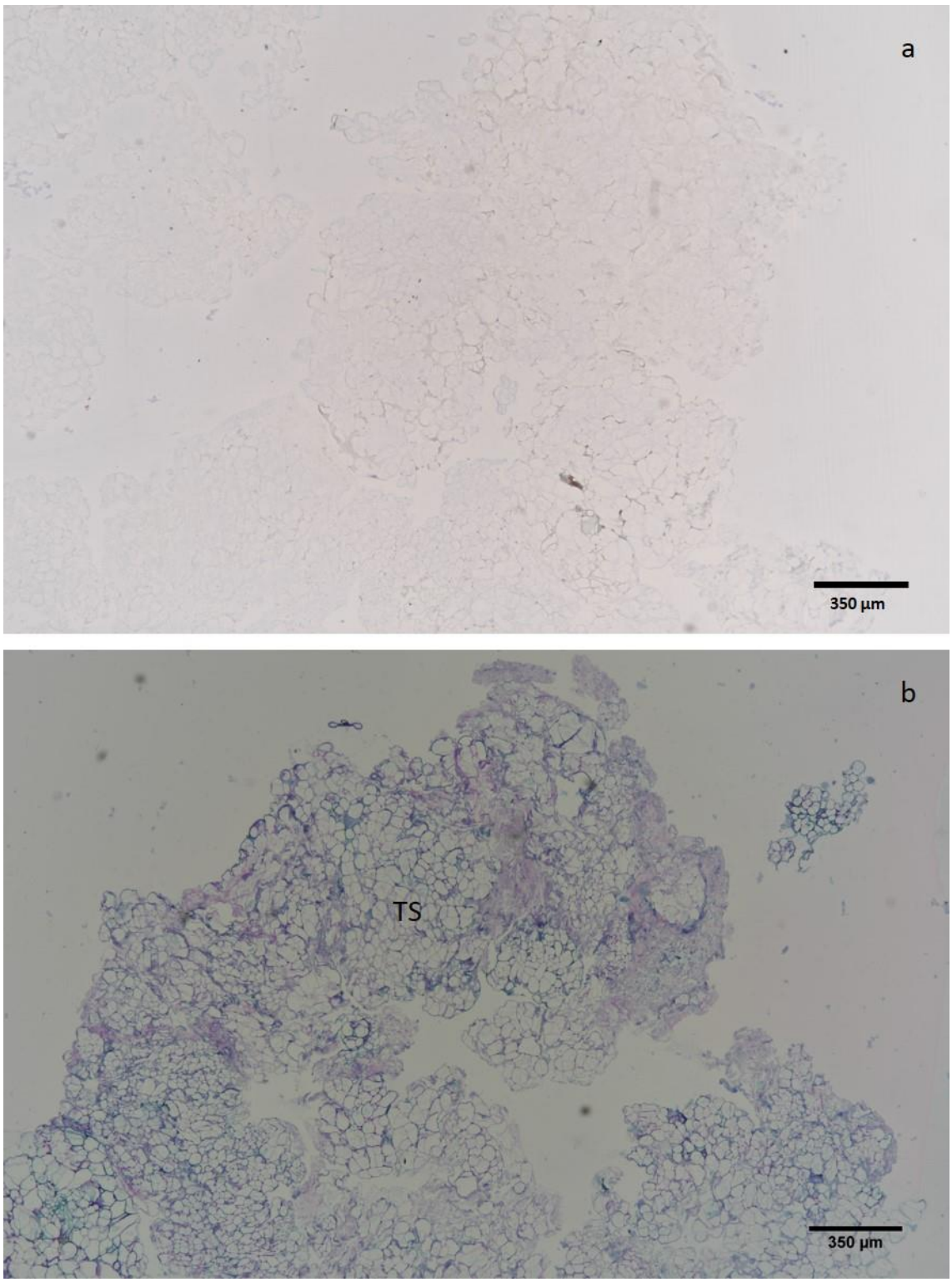

Figure 5 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals sain d'*Aquilaria crassna* après coloration par le réactif de Nadi (a) et par Acide Périodique-Schiff et Naphthol-Blue-Black (b) et grossi 4x. Ce cal témoin n'est composé que de tissu sain (TS) (b). Aucun résidu terpénique n'est remarquable après coloration au réactif de NaDi (a).

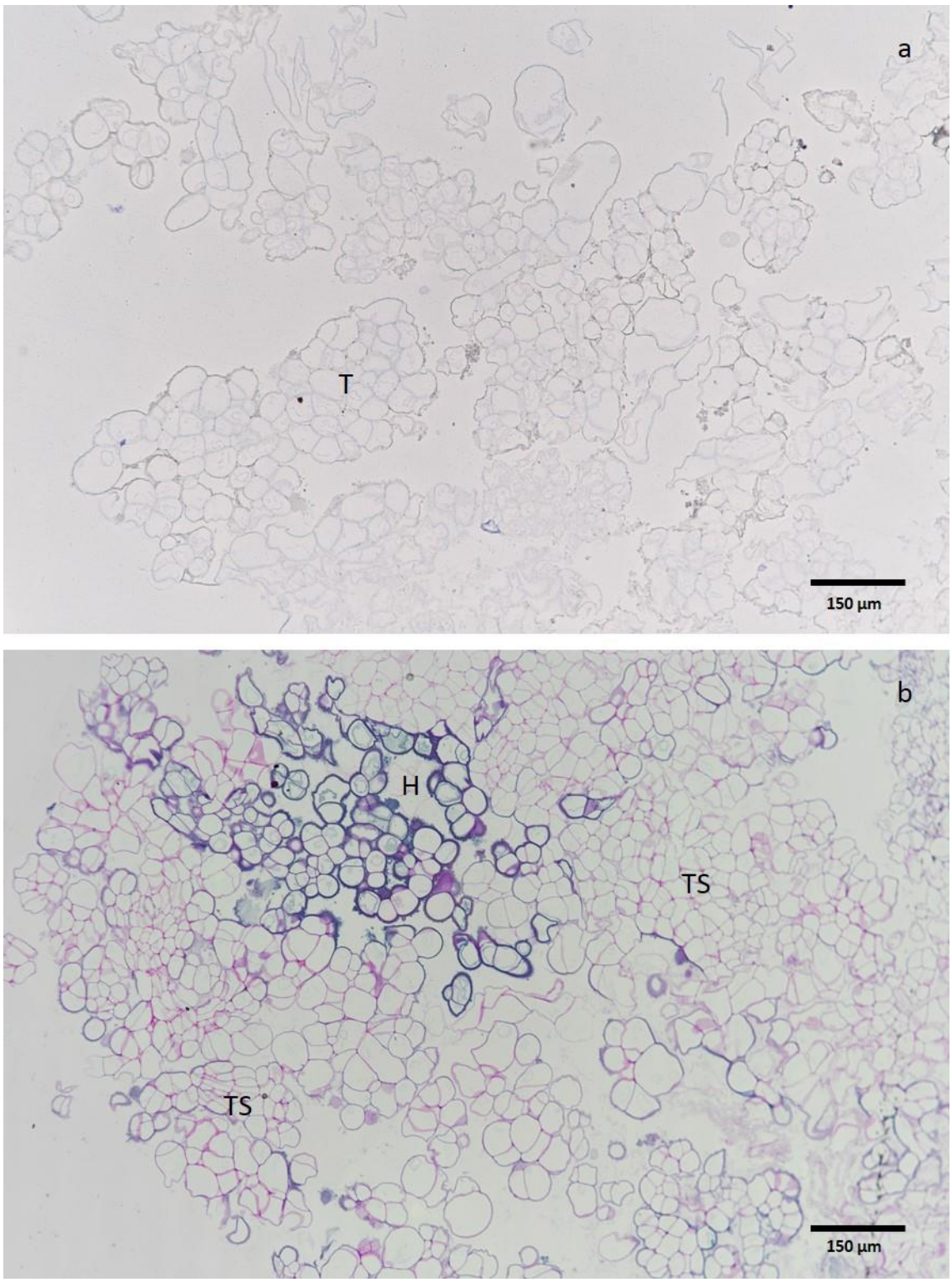

Figure 6 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals d'*Aquilaria crassna* inoculés avec le champignon *Pycnoporus sanguineus*
après coloration par le réactif de Nadi (a) et par Acide Périodique-Schiff et Naphthol-Blue-Black (b) et grossi 10x. On remarque le tissu sain (TS) et le tissu colonisé par les hyphes (H) de *Pycnoporus sanguineus* (b). Autour de la plupart des cellules, on remarque un léger dépôt bleu caractéristique des terpènes après coloration par le réactif de NaDi (a).

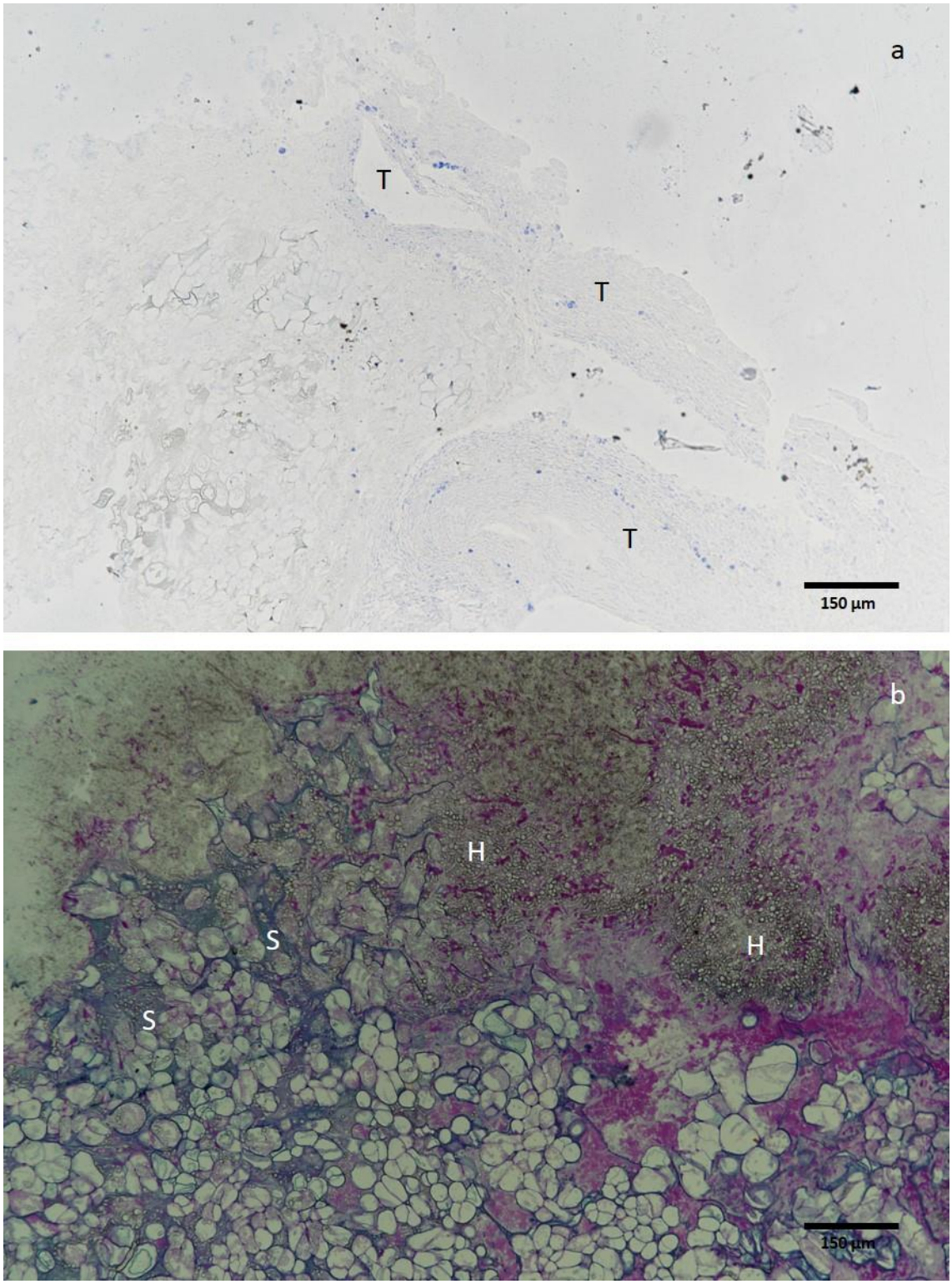

Figure 7 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals d'*Aquilaria crassna* inoculés avec le champignon *Gloeophyllum trabeum*
après coloration par le réactif de Nadi (a) et par Acide Périodique-Schiff et Naphthol-Blue-Black (b) et grossi 10x. On remarque qu'une grande partie du tissu est colonisée par les hyphes (H) de *Gloeophyllum trabeum* et la présence de sécrétions indéterminées (S) ; (b) Autour de beaucoup de cellules, on remarque un dépôt bleu caractéristique des terpènes (T) après coloration par le réactif de NaDi (a).

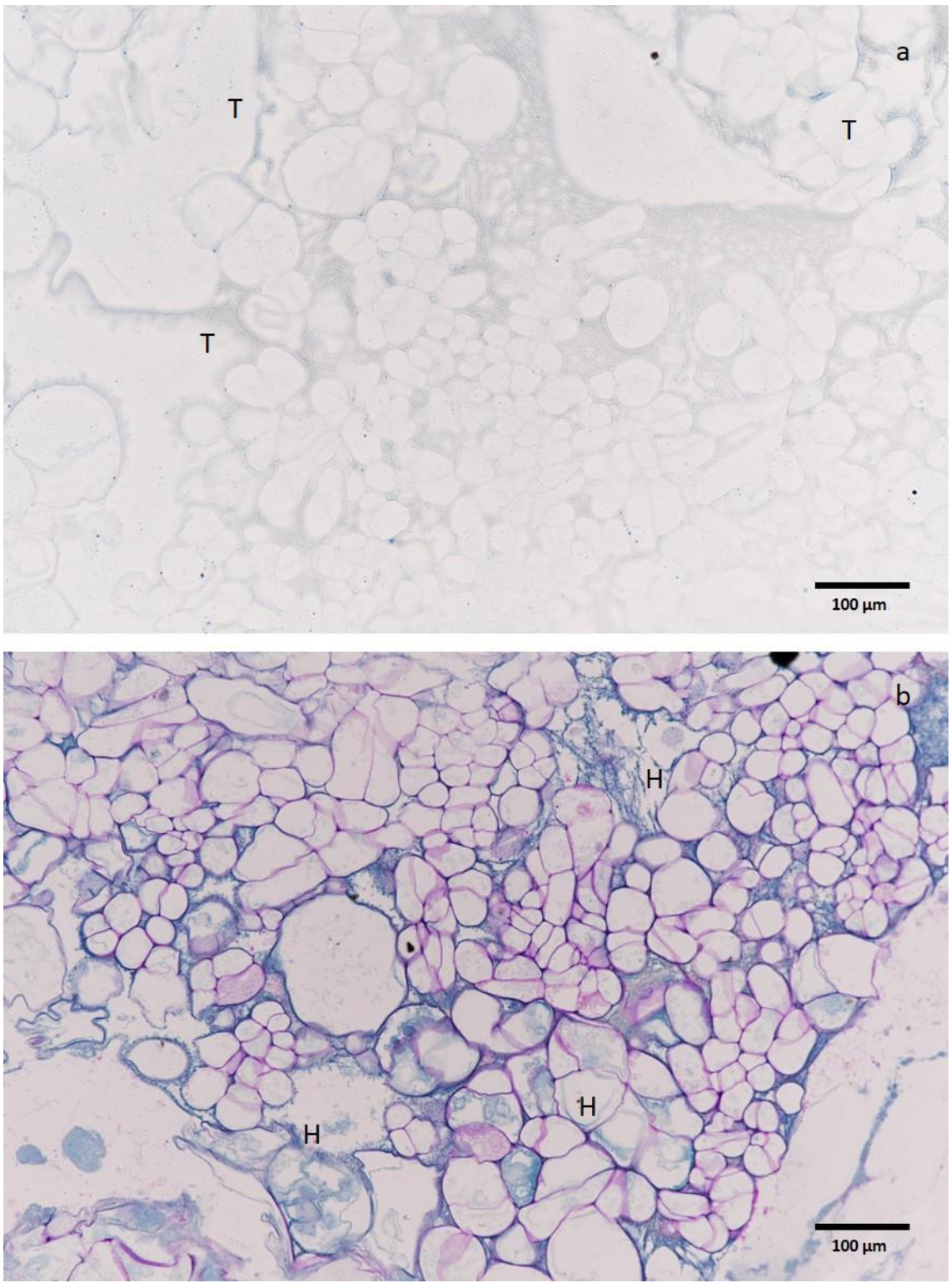

Figure 8 : Observation au microscope optique d'une coupe de cals d'*Aquilaria crassna* inoculés avec le champignon *Antrodia vaillantii*
après coloration par le réactif de Nadi (a) et par Acide Périodique-Schiff et Naphthol-Blue-Black (b) et grossi 20x. On remarque que l'ensemble du tissu est colonisé par les hyphes (H) d'*Antrodia vaillantii* (b). Autour de beaucoup de cellules, on remarque un léger dépôt bleu caractéristique des terpènes (T) après coloration par le réactif de NaDi (a).

L'autre coloration utilisée ici, est une coloration au NaDi pour mettre en évidence la présence de terpènes dans les cals. En effet, les terpènes se retrouvent dans les oléorésines et les huiles essentielles qui sont les éléments d'intérêt dans l'exploitation de l'agarwood issu des arbres d'*Aquilaria* spp. Un tableau de synthèse sur les résultats des colorations sur les quatre cals est présenté Tableau I.

En comparaison avec le cal sain (Figure 5a), qui ne présente aucune coloration bleue, caractéristique des terpènes, et après coloration avec le réactif de NaDi, les cals inoculés avec des champignons présentent des vésicules bleues caractéristiques de la présence de composés terpéniques, classiquement présents dans les oléorésines et les huiles essentielles de l'agarwood (Naef 2011). On remarque ces vésicules bleues notamment sur le cal colonisé par la souche de PS (Figure 6a), et en proportion moindre, sur les cals colonisés par GT (Figure 7a) et AV (Figure 8a). Ces résultats sont en accord avec ceux présentés lors de notre étude intitulée « Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction.» (Chapitre 2, Article 1), où nous avons mis en évidence que la souche PS est celle qui donne l'huile essentielle aux caractéristiques chimiques se rapprochant le plus de celle d'agarwood industriel et qui est celle qui procure le plus fort rendement en huile essentielle. Comme le précise Machenaud (2012) dans ses travaux sur la sécrétion du parfum chez la rose, les colorations spécifiques des terpènes sont rares et la coloration au NaDi est fiable même si des preuves convergentes doivent y être associées, telles que des analyses biochimiques d'identification des composés.

Une analyse chimique de ces terpènes permettrait de savoir s'il s'agit de composés caractéristiques de l'agarwood. La mise en place d'une étude pour extraire de l'huile essentielle de cals colonisés par différents champignons serait également envisageable, pour estimer d'une part la composition chimique du ou des composés observés et d'autre part leur rendement. Arriver à produire de l'agarwood en laboratoire, à partir de cal, pourrait permettre de proposer une alternative de production de molécules terpéniques de l'agarwood pour le secteur de la parfumerie et de la cosmétologie, et par la même occasion de contribuer à la sauvegarde du genre *Aquilaria* dans son milieu naturel, genre qui est classé en danger critique d'extinction par la CITES (CITES 2004). Ainsi, la callogénèse à partir de feuilles pourrait rendre l'approche plus aisée que le travail sur le bois requis actuellement pour la production d'agarwood en

champs. Aussi, des études sur le transcriptome d'*Aquilaria* ont déjà été menées sur des cals (Siah *et al.* 2016), stressés par des stress mécaniques. Il serait donc envisageable de procéder à des travaux sur le transcriptome, à partir de cals d'*Aquilaria* inoculés avec des souches de champignons, pour révéler les gènes impliqués dans la formation d'oléorésine telle que celle de l'agarwood lors de cette interaction.

Tableau 1 : Récapitulatif des observations réalisées après les colorations combinées de l'Acide Périodique-Schiff et du Naphthol-Blue-Black et au réactif de NaDi des coupes de cals sains et inoculés par les souches de PS, GT et AV.

	Forme des cellules du cal (observation au PAS + NBB)	***Colonisation par les champignons (observation au PAS + NBB)***	***Sécrétions indéterminées associées aux champignons (observation au PAS + NBB)***	***Vésicules bleues (observation au NaDi)***
Cal sain	Cellules organisées, plutôt anguleuses	Absence	Absence	Absence
Cal inoculé avec PS	Cellules organisées & cellules arrondies	Présence ++ En amas autour des cellules du cal	Absence	Présence +
Cal inoculé avec GT	Cellules organisées & cellules arrondies	Présence +++ Hyphes visibles	Présence	Présence +++
Cal inoculé avec AV	Cellules organisées & cellules arrondies	Présence ++ Hyphes visibles	?	Présence +

CONCLUSION

Quatre cals issus de feuilles de *A. crassna* ont été observés en microscopie optique dont trois étaient colonisés par des champignons Basidiomycètes après un délai d'incubation de deux mois. Bien que des travaux sur des cals d'*Aquilaria* ont déjà été menés, c'est la première fois que des travaux sont menés sur des cals inoculés par des souches de champignons lignivores, notamment *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* et *Antrodia vaillantii*. L'approche histologique à partir de techniques de colorations classiques comme de la coloration Acide Périodique-Schiff et Naphthol-Blue- Black a permis de mettre en évidence des colonisations dépendantes de la souche de champignon, avec notamment une colonisation de la totalité du cal par *Gloeophyllum trabeum,* GT. Les colonisations des cals par les champignons et la présence de sécrétions qui leur semble concomitantes pourraient être un mécanisme de réaction des cals à l'invasion par le champignon. La coloration au réactif de NaDi a mis en évidence la présence de terpènes, composés caractéristiques des huiles essentielles et résines, particulièrement présents dans l'agarwood, et ce de façon préférentielle dans le cal contaminé avec la souche de *Pycnoporus sanguineus*, PS. De nouvelles expérimentations sont à envisager afin de déterminer avec précision la nature des composés de ces sécrétions, à partir d'autres techniques d'histologie et de techniques d'analyse telles que la GC-MS, afin de démontrer s'il s'agit bien des mêmes composés que ceux présents dans les huiles essentielles d'agarwood. Cependant, ces résultats, qui coïncident avec les résultats de l'étude « Composition chimique de l'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre Ex. Lecomte des plantations de Guyane, en fonction du mode d'induction.» (Chapitre 2, Article 1) sont très encourageants pour envisager de poursuivre des études sur des cals inoculés par des souches de champignons sélectionnés, en lien avec la composition en métabolites synthétisés.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Projet Aquil@Guyane: Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'*« Aquilaria* (Agarwood) *»* haut de gamme, et de produits dérivés, en Guyane, co-financé par l'Europe, la Collectivité Territoriale de Guyane et le CIRAD : Fonds de développement régional (FEDER) pour la Guyane française (convention n ° FEDER / 2017 / N ° 31).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barden A, Anak NA, Mulliken T, Song M (2000) Heart of the matter: agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis*. : 60, Url: http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Traf-072.pdf

Blanchette RA, Jurgens JA, Heuveling van Beek H (2015) Growing *Aquilaria* and production of agarwood in hill agro-ecosystems. In: *Integrated Land Use Management in the Eastern Himalayas*. Eds K. Eckman and L. Ralte. Delhi, India, p. 66-82

Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1992) Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) *à* partir d'explants foliaires : étude histologique. *Can. J. Bot.* 70 : 735-741

Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), 2004. "Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Consideration of proposals for amendment of appendices-I and –II *Aquilaria* spp. and *Gyrinops* spp.". In: *Proceedings of the Thirteen Meeting of the Conference of the Parties*, Bangkok, Thailand, October 2 to 14, 2004

Cui J, Guo S, Fu S, Xiao P, Wang M (2013) Effects of inoculating fungi on agilawood formation in *Aquilaria sinensis*. Chinese Science Bulletin, 58(26): 3280-3287. https://doi.org/10.1007/s11434-013-5856-5

David R, Carde JP (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif NaDi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, Paris 258 : 1338-1340

Dolly M (2019) Diversité génétique des arbres du genre *Aquilaria* en Guyane et caractéristiques des espèces fongiques associées à la production de bois d'agar au sein des arbres. *Rapport Cirad*, Montpellier, 32 p

Dring D (1955) A Periodic Acid-Schiff Technique for staining fungi in higher plants. *The New Phytologist* 54(2): 277-279

Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie,* 16: 92-96

Fougerousse M (1979) Préservation des menuiseries contre la pourriture. *Bois et Forêts des Tropiques* 183: 49-66

Kalita J, Bhattacharyya PR, Boruah HPD, Unni BG, Lekhak H, Nath SC (2015) Association of *Zeuzera conferta* Walker on agarwood formation in *Aquilaria malaccensis* Lamk. *Asian J. Plant Sci. Res.:* 5: 4–9

Machenaud J (2012) Biosynthèse du 2-phényléthanol et sécrétion du parfum chez la rose. Saint-Etienne, France, 184 p

Mohamed R, Jong PL, Zali MS (2010) Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Diversity* 43: 67-74

Mohamed R, Jong PL, Nurul Irdayu I (2014) Succession patterns of fungi associated to wound-induced agarwood in wild *Aquilaria malaccensis* revealed from quantitative PCR assay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(9): 2427–2436, doi: 10.1007/s11274-014-1668-2

Morcillo F, Ilbert P, Labeyrie A, Zaremski C, Zaremski A (2018). Elaboration d'une méthodologie pour une production de cals d'*Aquilaria*. *Agritrop* Cirad, Montpellier, 15p

Naef R (2011) The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review. *Flavour and Fragrance Journal* 26(2): 73–87, doi: 10.1002/ffj.2034

Naziz PS, Das R, Sen S (2019) The scent of stress: evidence from the unique fragrance of agarwood. *Frontiers in Plant Science* 10:840, doi: 10.3389/fpls.2019.00840

Okudera Y, Ito M (2009) Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria* calli and cell suspension cultures. *Plant Biotechnology* 26: 307–315. https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.26.307

Saikia M, Shrivastava K, Sureshkumar Singh S (2012) An efficient protocol for callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam. using leaf explants at varied concentrations of sucrose. *International Journal of Plant Research* 2: 188–194. https://doi.org/10.5923/j.plant.20120206.03

Siah CH, Namasivayam P, Mohamed R (2016) Transcriptome reveals senescing callus tissue of *Aquilaria malaccensis*, an endangered tropical tree, triggers similar response as wounding with respect to terpenoid biosynthesis. *Tree Genetics & Genomes* 12: 33 https://doi.org/10.1007/s11295-016-0993-z

Soehartono T, Mardiastuti A (1997) The current trade in Gaharu in West Kalimantan. *Biodiversitas Indonesia* 1: 1-10

Starr GF, Dawe CJ, Weed LA (1955) Use of Periodic Acid-Schiff stain in identification of pathogenic fungi in tissues. *American Journal of Clinical Pathology* 25(1): 76-83

Tan CS, Isa NM, Ismail I, Zainal Z (2019) Agarwood induction: current developments and future perspectives. *Frontiers in Plant Science* 10: 122. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00122

Zaremski A (2005) Les Aphyllophorales impliquées dans la dégradation du bois : taxonomical characterisation, phylogeny and early detection of infection. Marseille : *Université de Provence*, Marseille, 148 p

Zaremski C, Ducousso-Détrez A, Amusant N *et al.*(2019) Taxonomic study of French Guiana fungi to identify and isolate pure cultured fungi for oleoresin production in *Aquilaria*: use of sequences from the small ribosomal DNA (r) subunit (SSU) and the two primer pairs SR6/SR10R and SR7/SR1R. *PRO Ligno* 15(3): 3-15

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, *et al.* (2018) NGS identification of fungi potentially implicated in the production of agarwood from *Aquilaria* spp. Trees. *PRO Ligno* 14(3): 9-18

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La stimulation de la production d'oléorésine par des méthodes inadaptées est un des problèmes, parmi d'autres, que rencontre le marché de l'agarwood et des autres produits dérivés du genre *Aquilaria*. A cela s'ajoutent d'autres problèmes tels que le contrôle de la génétique de la plante, la maîtrise de la conduite des plantations d'*Aquilaria*, l'initiation de la production d'agarwood et sa maturation en interaction avec des micro-organismes sélectionnés qui doivent permettre d'obtenir un agarwood de très haute qualité, ainsi que les méthodes d'extraction des huiles essentielles.

Le prix très élevé de cette matière première et la demande croissante sur le marché mondial d'un produit de qualité incitent à améliorer les capacités de production d'un agarwood de composition chimique contrôlée par les planteurs. Face à cette demande, plus particulièrement à celle d'agriculteurs guyanais originaires du Laos, très au fait des potentialités de l'agarwood et des autres dérivés d'*Aquilaria*, désireux de diversifier leurs activités, des plantations expérimentales d'arbres du genre *Aquilaria* ont été entreprises en Guyane.

Sans aucunes connaissances sur le comportement de cette espèce en milieu amazonien, la problématique générale de ce travail était : comment aider les planteurs d'*Aquilaria* de Guyane à produire une huile essentielle de composition chimique contrôlée, unique sur le marché mondial par sa composition et son mode de production, respectueux de la biologie de l'arbre et de l'environnement ?

Face à ces enjeux, l'objectif du travail a été de mener des recherches pour développer la production d'agarwood par les *Aquilaria crassna* plantés en Guyane. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les communautés fongiques présentes dans le bois des *Aquilaria crassna* de Guyane. Ensuite, nous avons évalué la composition des huiles essentielles obtenues après inoculations par des champignons de Guyane de ces arbres. Enfin, nous avons testé la capacité de cellules de cals d'*Aquilaria crassna* à produire de l'agarwood après inoculation de champignon, en laboratoire.

La démarche expérimentale innovante, les résultats précurseurs et les perspectives prometteuses de ces travaux de thèse sont présentés ci-après.

Une démarche expérimentale innovante pour la production d'agarwood en Guyane

Le projet est novateur et pionnier en Guyane, alors que l'agarwood, fort de son succès, et son mode de production par les arbres d'*Aquilaria* spp. est fortement étudié, notamment en Asie du Sud-Est, en Chine et en Inde. Mais en l'absence de connaissances sur le comportement de cette espèce en Guyane, il s'agissait, au regard des recherches existantes, de sélectionner les plus pertinentes afin de définir l'approche qui sera mise en œuvre en Guyane tout en évitant les écueils.

Plusieurs facteurs nous sont apparus prioritaires : le genre *Aquilaria* est en danger d'extinction dans son milieu naturel et l'huile essentielle de « qualité » semble de plus en plus rare au regard des attentes du marché. Le projet devait donc répondre à ces deux problèmes. La conservation du genre *ex situ*, sous couverts d'accords et de partenariat, notamment avec le Laos, est notre réponse à la première problématique. Cela est un des objectifs du projet Aquil@Guyane.

Pour la question de la production d'huile essentielle de qualité contrôlée, les écueils à éviter étaient le non-respect de la biologie de la plante et l'ajout de produits chimiques pour induire la production d'agarwood. Il était important, dans une première étape, de connaître les cortèges de micro-organismes susceptibles de coloniser l'espèce en Guyane. Aussi, après avoir déterminé, par des outils moléculaires, les espèces d'*Aquilaria* présentes sur les champs des agriculteurs, nous avons caractérisé les communautés fongiques qui vivent en interaction avec ces arbres. Le but était d'identifier des champignons couramment retrouvés dans l'agarwood, mais aussi des champignons propres aux conditions rencontrées en Guyane, et plus spécifiquement aux champs d'expérimentation, qui pourraient induire une composition singulière de l'agarwood des champs de Guyane.

Ces essais nous ont permis de constater que peu de Basidiomycètes sont présents dans le bois d'*Aquilaria* avant la production d'agarwood alors qu'ils sont couramment présents dans l'agarwood, ce que nous avons pu vérifier avec nos agarwoods témoins et que nous avions observé lors d'une étude préalable. Nous avons comparé deux méthodes d'induction de l'agarwood : une méthode d'induction par blessure avec ou sans ajout de terre et une méthode d'induction par inoculation de champignon. Dans notre

démarche de production biologique et localisée en Guyane, nous avons décidé d'inoculer les *A. crassna* des plantations de Guyane avec des champignons Basidiomycètes lignivores dont les souches sont originaires de Guyane, à partir d'éprouvettes de bois colonisées par une souche pure, dans le but d'éviter d'ajouter un adjuvant chimique. En effet, les ajouts d'adjuvants, couramment utilisés en Asie du Sud-Est impactent la qualité des huiles essentielles d'agarwood. Dans notre étude, nous avons donc décidé de ne pas inclure d'adjuvants chimiques et d'utiliser des champignons de Guyane pour trouver un équilibre entre l'induction des mécanismes de défense et le respect de la biologie de l'arbre et de son environnement.

Pour étayer ces résultats nous avons utilisé la Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) pour la différenciation des différentes catégories de bois allant du bois blanc à l'agarwood. Cette technique n'avait encore jamais été appliquée sur l'agarwood ni sur l'*Aquilaria*. Elle est pourtant très pertinente comme outil de classification des bois et comme outil de détection rapide de la composition chimique du bois. Nous avons pu le confirmer : la SPIR est un outil à développer pour le classement des agarwoods.

Enfin, forts de nos résultats obtenus en champs, nous avons mis au point une méthode de culture de cals d'*Aquilaria*. Cals que nous avons, ensuite, inoculés avec certaines des souches de champignons utilisées en champs, pour comparaison au laboratoire, dans le but de mettre en évidence leur capacité à produire les métabolites secondaires de l'agarwood. De même, cette approche méthodologique n'avait jamais été mise en œuvre chez *Aquilaria*.

Des résultats précurseurs dans la production d'agarwood de composition contrôlée, dans le respect de la biologie d'*Aquilaria*

Sur les champs d'*A. crassna* en Guyane, nous avons caractérisé les souches de champignons qui sont en interaction avec les *A. crassna,* avant et après blessure des arbres. Ainsi, nous avons mis en évidence des variations de cortèges de micro-organismes entre les parcelles et entre les arbres sains et blessés d'une même parcelle.

Dans le village de Cacao, on remarque que deux genres de champignons principaux sont en interaction avec les arbres sains, il s'agit d'*Aspergillus* et de *Nigrospora*. Dans le village de Régina, les genres de champignons associés aux arbres sains sont *Cladosporium* et *Periconia*. Ce dernier genre, *Periconia*, est le genre majoritaire dans les arbres blessés de Régina.

A Cacao, les arbres blessés sont en interaction avec deux souches principales pour les parcelles A et B, respectivement *Paraphaeosphaeria* et *Cladosporium* alors que les arbres de la parcelle C sont en interaction avec plusieurs genres dont aucun n'est majoritaire. Ainsi, même si les genres *Cladosporium* et *Nigrospora* sont souvent relatés dans la littérature comme genres de champignons associés à *Aquilaria*, les genres *Paraphaeosphaeria et Periconia,* ne le sont pas.

Ces champignons endophytes sont donc caractéristiques des plantations de Guyane. Grâce à la caractérisation des souches de champignons présents dans les *Aquilaria* sains, en comparaison avec des agarwood témoin du Laos, nous avons mis en évidence que bien que très présents dans les témoins d'agarwood, les Basidiomycètes ne sont presque pas présents, au profit des Ascomycètes, dans le bois sain.

C'est d'après ce résultat que nous avons décidé d'inoculer, en souche pure, des champignons Basidiomycètes lignivores de Guyane dans des arbres d'*A. crassna* de Guyane. Nous avons sélectionné ces champignons pour leur origine Guyanaise, pour leur caractère lignivore, pour la relative facilité à les cultiver en souche pure. Dans cette sélection nous avons veillé à avoir des champignons de pourriture fibreuse et des champignons de pourriture cubique afin de comparer leurs efficacités. Nous avons aussi comparé ce mode d'inoculation au mode d'inoculation par blessure avec ou sans ajout de terre. Nous avons obtenu une production d'agarwood par les *A. crassna* de Guyane, confirmée par les résultats de chimie et l'analyse par chromatographie en phase liquide, qui révèlent effectivement les composés caractéristiques de l'agarwood. Ainsi, la méthode d'induction de l'agarwood par inoculation de champignons lignivores de Guyane en souche pure, notamment des champignons de pourriture fibreuse *Ganoderma resinaceum*, *Gloeophyllum trabeum* et *Pycnoporus sanguineus* est la plus adaptée pour obtenir un agarwood de qualité proche de notre témoin d'agarwood du Laos. En effet, on retrouve dans les agarwoods résultants de l'interaction avec ces champignons les composés caractéristiques de l'agarwood, notamment, le phenylbutane, l'eudesmol, l'agarospirol, le jinkoh-eremol, le valenca et le valerianol.

De plus, il s'avérait important de proposer un outil simple, peu coûteux et non destructif permettant de contrôler le niveau de mâturation de l'agarwood associé à cette qualité. Aussi, nous avons utilisé la Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) pour différencier les différents bois d'*A. crassna* de Guyane, en allant du bois blanc à l'agarwood. Les résultats obtenus, qui concordent avec ceux de l'analyse par chromatographie en phase liquide, indiquent que l'utilisation de la SPIR pour différencier les compositions chimiques des huiles essentielles d'agarwood en amont de l'hydrodistillation est parfaitement envisageable.

De plus, cette méthode novatrice d'induction qui s'est vu être une réussite en champs a, par la suite, fait l'objet d'expérimentation en laboratoire par l'inoculation de cals d'*Aquilaria* par deux des souches prometteuses de l'étude en champs. Les souches *P. sanguineus*, et *G. trabeum,* dont nous avions prouvé l'efficacité*,* ont été comparées à une souche de pourriture cubique *A. vaillantii.* Les résultats montrent que la production de terpènes par les cals d'*Aquilaria* contaminés par des souches de champignons de pourriture fibreuse est possible en laboratoire. Cela permet d'envisager la mise en place de recherches innovantes en vue de développer de l'agarwood en laboratoire, à partir de cals d'*Aquilaria.* Cela permettrait également d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de défenses des cellules d'*Aquilaria,* et les voies de biosynthèse associées, face à l'agression fongique.

L'agarwood en Guyane : du projet à sa réalisation

Le projet Aquil@Guyane a été élaboré à la demande des agriculteurs des villages de Cacao et de Régina, en Guyane, qui désiraient produire localement de l'agarwood de qualité, dans le but d'être commercialisé et reconnu sur le marché international. Les résultats obtenus dans cette thèse sont une base indispensable pour envisager la production d'agarwood destinée à la distillation à plus large échelle et pour la mise en place d'une filière.

Durant le travail de thèse, il est apparu nécessaire de continuer les recherches dans le sens de la mise en place de plantations d'*Aquilaria* à large échelle, destinées à la production de feuilles pour le secteur de la tisanerie-santé, d'huiles essentielles et d'agarwood répondants aux standards attendus sur le marché. La production de

plants d'*Aquilaria*, qui nécessitera un accroissement des surfaces plantées, permettra la création d'une filière locale autour de la valorisation d'*Aquilaria*. La disponibilité de la ressource pouvant être un frein, il faudra identifier des voies alternatives de production de plants. Pour ce faire, il s'agira de tester deux méthodes de multiplication végétative afin de définir des itinéraires techniques de production de plants d'*Aquilaria* : cultures *in vitro* et par bouturage.

Le modèle développé en Guyane pour la production d'huiles essentielles à partir d'agarwood d'*Aquilaria* repose sur la mise en place de plantations dont on induit la production d'agarwood par diverses méthodes. Il y a lieu de poursuivre l'acquisition de connaissances, notamment après des durées plus longues d'inoculation. Ainsi, on pourra étudier les rendements dans un contexte pour proche de la réalité agricole, mais également l'évolution de la composition de l'agarwood dans le temps et l'impact de la contamination sur la survie des arbres. Les études proposées peuvent être les suivantes : la production de l'agarwood à partir des champignons identifiés les plus performants durant le travail de thèse; la sélection de nouvelles souches guyanaises pour la production de l'agarwood.

Plusieurs paramètres sont susceptibles d'influer sur la quantité et surtout la qualité de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation. Les principaux sont l'âge et la taille de l'arbre, ainsi que le traitement (ou contamination) subi par celui-ci au cours de sa croissance. En effet, la matière première qui nous intéresse étant la biomasse ligneuse, il est important de trouver une situation optimale pour l'obtention de bons rendements. Par ailleurs, la zone géographique, en termes de qualité des sols, le micro-climat, en termes de pluviométrie, brumes et ensoleillement, l'altitude, en termes de température et de brumes matinales seront autant de facteurs susceptibles d'influer sur la croissance des arbres et sur la formation et la qualité de l'oléorésine. Ainsi, les plantations de Cacao devraient se comporter différemment de celles de Régina. Ces facteurs auront aussi une influence sur la production foliaire et les qualités phytochimiques. Cette étude sur la qualité des produits obtenus d'*Aquilaria* sera réalisée à partir de prélèvements issus des arbres *Aquilaria* qui ont été stressés par contamination fongique en septembre 2018. Des individus non agressés seront utilisés et étudiés comme témoin. Cette étude combinera la Spectroscopie Proche InfraRouge (SPIR), méthode de mesure non destructive pour l'arbre, qui est principalement utilisée pour l'analyse de composants connus.

La Guyane, dans le respect de la politique française et communautaire, cherche également à promouvoir un secteur agricole respectueux de l'environnement, des agriculteurs et des consommateurs. La Guyane, poumon vert français et européen en Amazonie, se doit de montrer une image positive de la préservation de son milieu, bénéfique à la politique du 4 pour 1000. Pour ces raisons, il importe que la troisième phase du projet Aquil@Guyane, oriente la composante agronomique de la conduite de l'*Aquilaria* sur une approche agroécologique / agroforestière. Le principe consiste à restaurer et à maintenir durablement la santé du sol et à promouvoir la biodiversité tant végétale qu'animale. Les génotypes d'*Aquilaria* cultivés et utilisés pour ce projet seront sauvegardés et intégrés dans les Centre des Ressources Biologiques (CRB) de Guyane et du Laos.

Il s'agira, également, d'étudier la faisabilité économique d'une filière de production durable de bois d'*Aquilaria* pour l'extraction d'huiles essentielles et de feuilles, pour la filière tisane-santé, dépendant des moyens humains et des retombées directes (financières) et indirectes (création d'emplois, reconnaissance de l'approche éco-citoyenne et de la plus-value, etc.) en fonction du marché local et en particulier du marché international.

Enfin, la perspective essentielle de ce travail est un transfert de compétences techniques vers les agriculteurs et un maintien des collaborations entre scientifiques et agriculteurs dans l'objectif d'une pratique toujours au fait des nouveautés scientifiques et des cadres législatifs internationaux.

Bilan des perspectives à la suite des travaux de thèse

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES GENERALES

©Agilent Technologies, Inc., 2016. Agilent DNA 7500 and DNA 12000. *Kit Guide. Agilent Technologies*. 24 p

Adam AZ, Lee SY, Mohamed R (2017) Pharmacological properties of agarwood tea derived from *Aquilaria* (Thymelaeaceae) leaves: An emerging contemporary herbal drink. *Journal of Herbal Medicine* 10: 37–44, doi: 10.1016/j.hermed.2017.06.002

Amusant N, Digeon A, Descroix L, Bruneau O, Bezard V, Beauchène J (2015) Planting rosewood for sustainable essential oil production: influence of surrounding forest and seed provenance on tree growth and essential oil yields. *Bois & Forêts des Tropiques* 326 (4): 57-65, doi: 10.19182/bft2015.326.a31283

Amusant N, Beauchène J, Digeon A, Chaix G (2016) Essential oil yield in Rosewood (*Aniba Rosaeodora* Ducke): Initial application of rapid prediction by Near Infrared Spectroscopy based on wood spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 24: 507–515, https://doi.org/10.1255/jnirs.1241

Andary C, Longepierre D, Le Cong K, Hul S, Zaremski A, Michaloud G (2019) Study of a chemotaxonomic marker able to identify the genus *Aquilaria* (Thymelaeaceae). *Bois & Forêts des Tropiques* 341: 29-38, https://doi.org/10.19182/bft2019.341.a31744

Ansel JL (2019) Le grand livre des arbres parfumeurs. *Cosmetic Valley,* Chartres, France. 145 p

Azren PD, Lee SY, Emang D, Mohamed R (2019) History and perspectives of induction technology for agarwood production from cultivated *Aquilaria* in Asia: a review. *Journal of Forestry Research* 30(1): 1–11, doi: 10.1007/s11676-018-0627-4

Banerjee NR, Furnes H, Muehlenbachs K, Staudigel H, Wit M (2006) Preservation of ~3.4–3.5 Ga microbial biomarkers in pillow lavas and hyaloclastites from the Barberton Greenstone Belt, South Africa. *Earth and Planetary Science Letters* 241(3): 707–722, doi: 10.1016/j.epsl.2005.11.011

Barden A, Anak NA, Mulliken T, Song M (2000) Heart of the matter: agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis*. Traffic network report, *TRAFFIC International*, Cambridge, 60 p, http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Traf-072.pdf

Ben-Gera I, Norris KH (1968) Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *Journal of Food Science* 33: 64 – 67, https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00885.x

Bertrand D, Courcoux P, Qannari EM (2006) Méthodes exploratoires. In : La spectrométrie infrarouge et ses applications analytiques. Eds Lavoisier. Paris, France, p. 317-345

Bertrand D, Dufour E (2006) La spectrométrie infrarouge et ses applications analytiques. Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires. Eds Lavoisier. Paris, France, 660 p

Bertrand D, Vigneau E (2006) Prétraitement des données spectrales. In : La spectrométrie infrarouge et ses applications analytiques. Eds Lavoisier. Paris, France, p. 427-447

Bhattacharyya B, Datta A, Baruah HK (1952) On the formation and development of agaru in *Aquilaria agallocha*. *Science and Culture* 18(5): 240–241

Blanchette RA, Jurgens JA, Heuveling van Beek H (2015) Growing *Aquilaria* and production of agarwood in hill agro-ecosystems. In: *Integrated Land Use Management in the Eastern Himalayas*. Eds K. Eckman and L. Ralte. Delhi, India, p. 66-82

Boye M, Chardonnaud M, Seurin M (1979) « La Guyane, Planche 5. Géomorphologie. » *Atlas des départements d'Outre-Mer*. Centre d'Etudes de Géographie Tropicale (CNRS). 12

Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1992) Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) *à* partir d'explants foliaires : étude histologique. *Can. J. Bot.* 70 : 735-741

Callahan BJ, Sankaran K, Fukuyama JA, McMurdie PJ, Holmes SP (2016) Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* 5:1492

Chaix G, Andrianoelisoa H, Menut C, Danthu P (2010) Identification des chémotypes de *Ravensara aromatica* par spectrométrie proche infrarouge. *Communication de congrès* : *29èmes journées internationales huiles essentielles et extraits*. 24 & 25 Juin 2010. Digne les Bains, France

Chakrabarty K., Kumar A., Menon V., 1994. Trade in agarwood. *WWF-India, TRAFFIC-India*, New Delhi, India, 59 p

Chen X, Sui C, Liu Y, Yang Y, Liu P, Zhang Z, Wei J (2017) Agarwood Formation Induced by Fermentation Liquid of *Lasiodiplodia theobromae*, the Dominating Fungus in Wounded Wood of *Aquilaria sinensis*. *Current Microbiology* 74(4): 460–468, doi: 10.1007/s00284-016-1193-7

Chen X, Liu Y, Yang Y, Feng J, Liu P, Sui C, Wei J (2018) Trunk surface agarwood-inducing technique with *Rigidoporus vinctus*: An efficient novel method for agarwood production. *PLOS ONE* 13(6): e0198111, doi: 10.1371/journal.pone.0198111

Chhipa H, Kaushik N (2017) Fungal and Bacterial Diversity Isolated from *Aquilaria malaccensis* Tree and Soil, Induces Agarospirol Formation within 3 Months

after Artificial Infection. *Frontiers in Microbiology* 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.01286

Chowdhury M, Hussain D, Chung SO, Kabir E, Rahman A (2016) Agarwood manufacturing: a multidisciplinary opportunity for economy of Bangladesh. *Agricultural Engineering International*: The CIGR e-journal 18(3):171-178

Chowdhury M, Rahman A, Hussain MD, Kabir E (2017) The economic benefit of agarwood production through aeration method into the *Aquilaria malaccensis* tree in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 42(1): 191-196, doi: 10.3329/bjar.v42i1.31992

Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), 2004. "Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Consideration of proposals for amendment of appendices-I and –II *Aquilaria* spp. and *Gyrinops* spp.". In: *Proceedings of the Thirteen Meeting of the Conference of the Parties*, Bangkok, Thailand, October 2 to 14, 2004

Cui J, Guo S, Fu S, Xiao P, Wang M (2013) Effects of inoculating fungi on agilawood formation in *Aquilaria sinensis*. Chinese Science Bulletin, 58(26): 3280-3287, https://doi.org/10.1007/s11434-013-5856-5

Cui J, Wang C, Guo S, Yang L, Xiao P, Wang M (2013) Evaluation of fungus-induced agilawood from *Aquilaria sinensis* in China. *Symbiosis* 60(1): 37–44, doi: 10.1007/s13199-013-0237-z

David R, Carde JP (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif NaDi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, Paris 258 : 1338-1340

Deep K, Tajuddin N (2019) King of scents — Agarwood. *Perfumer & flavorist* 44(3) : 42-56

De Granville JJ (1979) « La Guyane, Planche 12. Végétation. » *Atlas des départements d'Outre-Mer*. Centre d'Etudes de Géographie Tropicale (CNRS). 12

Dolly M (2019) Diversité génétique des arbres du genre *Aquilaria* en Guyane et caractéristiques des espèces fongiques associées à la production de bois d'agar au sein des arbres. *Rapport Cirad*, Montpellier, 32 p

Dring D (1955) A Periodic Acid-Schiff Technique for staining fungi in higher plants. *The New Phytologist* 54(2): 277-279

El Enshasy HA, Hanapi SZ, Malek RA, Abdelgalil SA, Leng OM (2019) Endophytic Fungi: The desired biostimulants for essential oil production. In: *Advances in Endophytic Fungal Research*: *Present Status and Future Challenges*, Eds Singh B. P. Cham, Switzerland, p. 211-232

Eurlings MCM, Gravendeel B (2005) TrnL-trnF sequence data imply paraphyly of *Aquilaria* and *Gyrinops* (Thymelaeaceae) and provide new perspectives for agarwood identification. *Plant Systematics and Evolution* 254(1): 1–12, doi: 10.1007/s00606-005-0312-x

Feng T, Li Q, Wang Y, Qiu S, He M, Zhang W, Dong J, Zhu S (2019) Phylogenetic analysis of *Aquilaria* Lam. (Thymelaeaceae) based on DNA barcoding. *Holzforschung* 73(6): 517–523, doi: 10.1515/hf-2018-0127

Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie,* 16: 92-96

Flæte PO, Haartveit EY, Vadla K (2006) Near infrared spectroscopy with multivariate statistical modelling as a tool for differentiation of wood from tree species with similar appearance. *New Zealand Journal of Forestry Science* 36(2/3): 382-392.

Fougerousse M (1979) Préservation des menuiseries contre la pourriture. *Bois et Forêts des Tropiques* 183: 49-66

Ghozland F, Fernandez X (2010) L'herbier parfumé : histoires humaines des plantes à parfum. Ed. *Plume de carotte*, Toulouse, France, 219 p

Gianno R (1986) The exploitation of resinous products in a lowland Malayan forest. *Wallaceana*: *Working Group on* Tropical Ecology *of the* International *Association of Ecology* (INTECOL) 43: 3-6

Giordanengo T (2004) Analyse de la variabilité génétique de quatre propriétés chimiques du bois d'hybrides d'*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* par utilisation de la Spéctrométrie Proche Infra Rouge. *Rapport de stage Cirad, Enstib*, 105 p

Gong LJ, Guo SX (2009) Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *Afr J Biotechnol* 8:731-736

Gratzfeld J, Tan B (2008) Agarwood - saving a precious and threatened resource. *Botanic Garden Conservation International* 5(1), Special issue: *Conserving forest biodiversity*: 27-29

Guilioni L (1991) Les plantes à parfum, aromatiques et médicinales en France : situation et perspectives. Essai de synthèse bibliographique. Ed. ENSAM, Montpellier, France, 17 p

Haartveit EY, Flæte PO (2008) Near Infrared Spectroscopy (NIRS) as a Tool for Effective Classification of Wood. Proceedings of the 51st International Convention of Society of Wood Science and Technology November 10-12, 2008 Concepción, CHILE Paper WS-25: 1-9

Hart JR, Norris KH, Golumbic C (1962) Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanol extracts. *Cereal Chemistry* 39: 94-99

Jensen A (2009) Valuation of non-timber forest products value chains. *Forest Policy and Economics* 11(1): 34–41, doi: 10.1016/j.forpol.2008.08.002

Jensen A, Meilby H (2008) Does commercialization of a non-timber forest product reduce ecological impact? A case study of the Critically Endangered *Aquilaria crassna* in Lao PDR. *Oryx* 42(02), doi: 10.1017/S0030605308007825

Jensen A, Meilby H (2010) Returns from Harvesting a Commercial Non-timber Forest Product and Particular Characteristics of Harvesters and Their Strategies: *Aquilaria crassna* and Agarwood in Lao PDR1. *Economic Botany* 64(1): 34–45, doi: 10.1007/s12231-010-9108-1

Kalita J, Bhattacharyya PR, Boruah HP, Unni BG, Lekhak H, Nath SC (2015) Association of *Zeuzera conferta* Walker on agarwood formation in *Aquilaria malaccensis* Lamk. *Asian J. Plant Sci. Res.:* 5: 4–9

Karlinasari L, Indahsuary N, Kusumo H, Santoso E, Turjaman M, Nandika D (2015) Sonic and ultrasonic waves in agarwood trees (*Aquilaria microcarpa*) inoculated with *Fusarium solani*. *Journal of Tropical Forest Science*: 27(3):351-356

Kuriakose S, Joe H (2012) Qualitative and quantitative analysis in sandalwood oils using near infrared spectroscopy combined with chemometric techniques. *Food Chemistry* 135(1): 213–218, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.073

Lee SY, Weber J, Mohamed R (2011) Genetic variation and molecular authentication of selected *Aquilaria* species from natural populations in Malaysia using RAPD and SCAR markers. *Asian Journal of Plant Sciences* 10(3): 202-211

Lee SY, Faridah-Hanum I, Mohamed R (2013) Vegetative description of three *Aquilaria* (Thymelaeceae) saplings in Malaysia. *Pertanika Journals of Tropical Agricultural Science* 36 (Special): 287-294

Lee SY, Mohamed R (2016a) The origin and domestication of *Aquilaria*, an important agarwood-producing genus. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. *Tropical Forestry Springer*, Singapore, pp 1–20, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_1

Lee SY, Mohamed R (2016b) Rediscovery of *Aquilaria rostrata* (Thymelaeaceae), a species thought to be extinct, and notes on *Aquilaria* conservation in Peninsular Malaysia. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 61(1): 13–19, doi: 10.3767/000651916X691196

Lee SY, Mohamed R, Faridah-Hanum I, Lamasudin DU (2017) Utilization of the internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence to trace the geographical sources of *Aquilaria malaccensis* Lam. populations. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 16(02): 103–111, doi: 10.1017/S1479262117000016

Leplat J (2012) Développement saprotrophe de *Fusarium graminearum* : rôle respectif de différents habitats naturels du champignon dans le processus d'infection du blé en Bourgogne ; recherche d'indicateurs prédictifs du risque de fusariose. *Thèse Université de Bourgogne, Unité Mixte de Recherche 1347 Agroecologie.* 306 p

Leti M, Hul S, Fouché JG, Cheng SK, David B (2013) Flore photographique du Cambodge. *Privat,* Toulouse, France, 589 p

Liu YY, Wei JH, Gao ZH, Zhang Z, Lyu JC (2017) A review of quality assessment and grading for agarwood. *Chinese Herbal Medicines* 9(1): 22–30, doi: 10.1016/S1674-6384(17)60072-8

Liu J, Wu J, Zhao YX, Deng YY, Mei WL, Dai HF (2008) A new cytotoxic 2-(2-phenylethyl) chromone from Chinese eaglewood. *Chinese Chemical Letters* 19(8): 934–936, doi: 10.1016/j.cclet.2008.05.034

López-Sampson A (2017) Growth physiology and productivity of cultivated *Aquilaria crassna* Pierre *ex* Lecomte (Thymelaeaceae) in tropical Australia and its reproduction biology. *College of Science and Engineering*, James Cook University, Australia, 138 p

López-Sampson A, Page T (2018a) History of Use and Trade of Agarwood. *Economic Botany* 72(1): 107–129, doi: 10.1007/s12231-018-9408-4

López-Sampson A, Page T (2018b) Elliptical Fourier Descriptors of Leaf Outlines: A Tool to Discriminate Among *Aquilaria* Species (Thymelaeaceae). *Silvae Genetica* 67(1): 89–92, doi: 10.2478/sg-2018-0012

Machenaud J (2012) Biosynthèse du 2-phényléthanol et sécrétion du parfum chez la rose. Saint-Etienne, France, 184 p

Mabberley DJ (2008) Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classifications, and uses, 3rd Ed. *Cambridge University Press*, Cambridge, England. XVIII-1021 p

McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8:e61217

Mei WL, Liu J, Li XN, Dai HF (2010) Study on the chemical constituents from Chinese eaglewood in Hainan. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 18: 573-576

Météo-France (2016a) « Moyenne annuelle des cumuls pluviométriques. », http://pluiesextremes.meteo.fr

Météo-France (2016b) « Moyenne annuelle du nombre de jours avec pluie >= 1 mm. » http://pluiesextremes.meteo.fr

Meyer S, Reeb C, Bosdeveix R (2008) Botanique. Biologie et physiologie végétales. 2e édition. *Collection Sciences fondamentales*, Maloine, Paris, France, 490 p

Mitra J, Gogoi P (2001) Fungi associated with the diseased wood (agarwood/agaru) of *Aquilaria agallocha* Roxb. grown in Assam. In Proceedings of Seminar on Scope and Dimension of Agar Plantation in NE Region of New Delhi, India, eds Ahmed M., Gogoi P., Ahmed G. U., editors. (Hojai: AATMA): 61–69

Mohamed R, Jong PL, Zali MS (2010) Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Diversity* 43: 67-74

Mohamed R, Jong PL, Nurul Irdayu I (2014) Succession patterns of fungi associated to wound-induced agarwood in wild *Aquilaria malaccensis* revealed from quantitative PCR assay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(9): 2427–2436, doi: 10.1007/s11274-014-1668-2

Monggoot S, Popluechai S, Gentekaki E, Pripdeevech P (2017) Fungal endophytes: an alternative source for production of volatile compounds from agarwood oil of *Aquilaria subintegra*. *Microbial Ecology* 74(1): 54–61, doi: 10.1007/s00248-016-0908-4

Morcillo F, Ilbert P, Labeyrie A, Zaremski C, Zaremski A (2018). Elaboration d'une méthodologie pour une production de cals d'*Aquilaria*. *Agritrop* Cirad, Montpellier, 15p

Mullis KB et Faloona FA (1985) Specific synthesis of DNA *in vitro via* a Polymerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-350

Naef R (2011) The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review. *Flavour and Fragrance Journal* 26(2): 73–87, doi: 10.1002/ffj.2034

Nakanishi T, Yamagata E, Yoneda K, Nagashima T, Kawasaki I, Yoshida T, Mori H, Miura I (1984) Three fragrant sesquiterpenes of agarwood. *Phytochemistry* 23(9): 2066–2067, doi: 10.1016/S0031-9422(00)84975-4

Naziz PS, Das R, Sen S (2019) The scent of stress: evidence from the unique fragrance of agarwood. *Frontiers in Plant Science* 10:840, doi: 10.3389/fpls.2019.00840

Ng LT, Chang YS, Kadir AA (1997) A review on agar (gaharu) producing *Aquilaria* species. *Journal of Tropical Forest Products* 2(2): 272-285

Niamké FB, Amusant N, Kadio AA, Thevenon M-F, Nourissier S, Adima AA, Jay-Allemand C, Chaix G (2014) Rapid prediction of phenolic compounds as chemical markers for the natural durability of Teak (*Tectona Grandis* Linn f.) heartwood by Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 22: 35-43, https://doi.org/10.1255/jnirs.1091

Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, Kennedy P, Picard K, Glöckner FO, Tedersoo L, Saar I, Kõljalg U, Abarenkov K (2019) The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res* 47:D259–D264

Nurdiyana ABS (2008) Comparison of gaharu *(Aquilaria malaccensis)* essential oil composition between each country. *Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering*, University Malaysia Pahang, 24 p

Okudera Y, Ito M (2009) Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria* calli and cell suspension cultures. *Plant Biotechnology* 26: 307–31https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.26.307

Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert JV (2014) Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE* 9:e97629

Page T, Awarau W (2012) Performance of agarwood *(Aquilaria crassna)* seedling transplants improved by shade and fertiliser. *Forest Ecology and Management* 265: 258–269, doi: 10.1016/j.foreco.2011.10.041

Papy G (1979) « La Guyane, Planche 3. Relief. » *Atlas des départements d'Outre-Mer*. Centre d'Etudes de Géographie Tropicale (CNRS). 3

Qiagen (2018) DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook. Qiagen. 24 p

Premalatha K, Kalra A (2013) Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from resinous and healthy wood of *Aquilaria malaccensis*, a red listed and highly exploited medicinal tree. *Fungal Ecology* 6(3): 205–211, doi: 10.1016/j.funeco.2013.01.005

Pripdeevech P, Khummueng W, Park SK (2011) Identification of odor-active components of agarwood essential oils from Thailand by Solid Phase Microextraction-GC/MS and GC-O. *The Journal of Essential Oil Research* 23(4): 46-53, https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700468

Rajoo KS, Abdu A, Abdul-Hamid H, Karam DS, Shamshuddin J, Jamaluddin ASB, Zhen WW (2013) Assessment of heavy metals uptake and translocation by *Aquilaria malaccensis* planted in soils containing sewage sludge. *American Journal of Applied Sciences* 10(9): 952-964, doi**:** 10.3844/ajassp.2013.952.964

Rasool S, Mohamed R (2016) Understanding agarwood formation and its challenges. In: Agarwood: Science behind the fragrance, Eds Mohamed R., Springer, Singapore, p. 39-56, https://doi.org/10.1007/978-981-10-0833-7_3

Sadgopal (1960) Explanatory studies in the development of essential oils and their constituents in aromatic plants. Part 1: *Oil of Agarwood*. SPC 33: 41-46

Saikia M, Shrivastava K, Sureshkumar Singh S (2012) An efficient protocol for callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam. using leaf explants at varied concentrations of sucrose. *International Journal of Plant Research* 2: 188–194, https://doi.org/10.5923/j.plant.20120206.03

Sen S, Dehingia M, Talukdar NC, Khan M (2017) Chemometric analysis reveals links in the formation of fragrant bio-molecules during agarwood *(Aquilaria malaccensis)* and fungal interactions. *Scientific Reports* 7(1): Article number: 44406, doi: 10.1038/srep44406

Siah CH, Namasivayam P, Mohamed R (2016) Transcriptome reveals senescing callus tissue of *Aquilaria malaccensis*, an endangered tropical tree, triggers similar response as wounding with respect to terpenoid biosynthesis. *Tree Genetics & Genomes* 12: 33, https://doi.org/10.1007/s11295-016-0993-z

Soehartono T, Mardiastuti A (1997) The current trade in Gaharu in West Kalimantan. *Biodiversitas Indonesia* 1: 1-10

Soehartono T, Newton AC (2001) Reproductive ecology of *Aquilaria* spp. in Indonesia. *Forest Ecology and Management* 152(1–3): 59–71, doi: 10.1016/S0378-1127(00)00610-1

Soehartono T, C. Newton A (2001) Conservation and sustainable use of tropical trees in the genus *Aquilaria* II. The impact of gaharu harvesting in Indonesia. *Biological Conservation* 97(1): 29–41, doi: 10.1016/S0006-3207(00)00089-6

Soehartono T, Newton AC (2000) Conservation and sustainable use of tropical trees in the genus *Aquilaria* I. Status and distribution in Indonesia. *Biological Conservation* 96(1): 83–94, doi: 10.1016/S0006-3207(00)00055-0

Starr GF, Dawe CJ, Weed LA (1955) Use of Periodic Acid-Schiff stain in identification of pathogenic fungi in tissues. *American Journal of Clinical Pathology* 25(1): 76-83

Subasinghe SMCUP, Hettiarachchi DS (2013) Agarwood resin production and resin quality of *Gyrinops walla* Gaertn. *International Journal of Agricultural Sciences* 3(1): 357-362

Tajuddin SN, Aizal CM, Yusoff MM (2016) Resolution of complex sesquiterpene hydrocarbons in *Aquilaria malaccensis* volatile oils using gas chromatography technique. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. Tropical Forestry. Springer, Singapore, pp 103–124, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_7

Tan CS, Isa NM, Ismail I, Zainal Z (2019) Agarwood induction: current developments and future perspectives. *Frontiers in Plant Science* 10: 122, doi: 10.3389/fpls.2019.00122

The Angiosperm Phylogeny Group, Chase MW, Christenhusz MJ M, Fay MF, Byng JW, Judd WS, *et al.* (2016) — An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society,* 181(1): 1–20, https://doi.org/10.1111/boj.12385

The Plant List (2013) Version 1.1. Published on the Internet; *http://www.theplantlist.org/ (accessed 1st January 2018)*

Turjaman M, Hidayat A, Santoso E (2016) Development of agarwood induction technology using endophytic fungi. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. Tropical Forestry. Springer, Singapore, pp 57–71, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_4

Tsuchikawa S, Inoue K, Noma J, Hayashi K (2003) Application of near-infrared spectroscopy to wood discrimination. *Journal of Wood Science* 49 (1): 29-35. https://doi.org/10.1007/s100860300005

Tsuchikawa S, Kobori H (2015) A review of recent application of near infrared spectroscopyto wood science and technology. *Journal of Wood Science* 61 (1): 213-220. https://doi.org/10.1007/s10086-015-1467-x

Watson L, Dallwitz MJ (1992) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version: 11th. February 2019

Wang MR, Li W, Luo S, Zhao X, Ma CH, Liu SX (2018) GC-MS Study of the chemical components of different *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilgorgans and agarwood from Different *Asian countries. Molecules* 23 (9), 2168, https://doi.org/10.3390/molecules23092168

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267

Yang Z, Lu B, Huang AM, Liu YN, Xie XQ (2012) Rapid identification of softwood and hardwood by near infrared spectroscopy of cross-sectional surfaces. *Spectroscopy and Spectral Analysis* 32: 1785–1789

Yin Y, Jiao L, Dong M, Jiang X, Zhang S (2016) Wood resources, identification, and utilization of agarwood in china. In: Mohamed R (ed), Agarwood: Science Behind the Fragrance. Tropical Forestry. Springer, Singapore, pp 21–38, doi: 10.1007/978-981-10-0833-7_2

Zaremski A (2005) Les Aphyllophorales impliquées dans la dégradation du bois : taxonomical characterisation, phylogeny and early detection of infection. Marseille : *Université de Provence*, Marseille, 148 p

Zaremski A (2018) Rapport d'exécution Intermédiaire du 1er janvier 2017 au 31 décembre 2018. Le projet Aquil@Guyane: "Bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'*Aquilaria* (Agarwood) " haut de gamme et de produits dérivés, en Guyane. *Agritrop CIRAD*, Kourou, 24 p

Zaremski C, Ducousso-Détrez A, Amusant N *et al.* (2019) Taxonomic study of French Guiana fungi to identify and isolate pure cultured fungi for oleoresin production in *Aquilaria*: use of sequences from the small ribosomal DNA (r) subunit (SSU) and the two primer pairs SR6/SR10R and SR7/SR1R. *PRO Ligno* 15(3): 3-15

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Andary C *et al.* (2017). NGS analysis of fungal OTUs in *Aquilaria* sp. from French Guyana, Cambodia, Laos and Thailand. In: *Proceedings IRG Annual Meeting* (ISSN 2000-8953). *IRG48 Scientific Conference on Wood Protection*, Ghent, Belgium, June 4-8, 2017: IRG/WP 17-50328

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Andary C. *et al.* (2018) NGS identification of fungi potentially implicated in the production of agarwood from *Aquilaria* spp. Trees. *PRO Ligno* 14(3): 9-18

Zhang L, Brockelman WY, Allen MA (2008) Matrix analysis to evaluate sustainability: The tropical tree *Aquilaria crassna*, a heavily poached source of agarwood. *Biological Conservation* 141(6): 1676–1686, doi: 10.1016/j.biocon.2008.04.015

Zhou M, Wang H, Suolangjiba, Kou J, Yu B (2008) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology* 117(2): 345–350, doi: 10.1016/j.jep.2008.02.005