

**RAPPORT PARRUR (Juin 2014)**

**ANDRIANJAFINANDRASANA Soloniony Navalonamanitra**

**Departement de Biologie Ecologie Végétales**

**Université d'Antananarivo**

## Rapport scientifique

### Introduction

Les pertes post-récolte en produits agricoles touchent 15% de la production en fruits dans le monde dont 5-10% en Afrique et en Amérique, 20-30% en Asie notamment les pays industrialisés, 10-20% en Europe (chiffres de la FAO, 2012). Les moyens de lutte sont surtout de nature chimique (dont l'amphotéricine B, la nystatine, la natamicine) et présentent des inconvénients financiers (notamment pour les paysans producteurs des pays pauvres) ainsi que des risques sanitaires et environnementaux (1-3).

La prolifération microbienne est favorisée dans les pays chauds et humides (4) et nuit à la conservation des fruits pendant le stockage et constitue une limite à leur commercialisation.

Notre recherche se propose de mettre au point les bases scientifiques d'une méthode alternative de traitement post-récolte transférable chez les agriculteurs et les commerçants malgaches (commerce local au bénéfice des populations pauvres ou commerce internationale pour une consommation dans les pays riches) pour améliorer la conservation des fruits tropicaux. La méthode reposera sur les propriétés toxiques des huiles essentielles ou HE (5), combinerait efficacité de préservation, bénéfice agricole, services environnementaux, respect de l'environnement, santé des consommateurs et mise en valeur des produits de la biodiversité (6,7,8). L'étude portera sur la conservation post-récolte de 3 fruits (la banane, la mangue et la papaye) et sera basée sur deux HE malgaches reconnus pour leurs propriétés biologiques et dont la composition chimique a été établie : *Ravensara aromatica* Sonnerat (9-11) et *Eugenia caryophylla* ou le girofle (12-13).

Dans le cadre de cette thèse, intitulé « Evaluation des potentialités fongitoxiques des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* et de girofle en traitement après récolte des fruits tropicaux (mangue, papaye, banane) », le projet PARRUR a mis à notre disposition Ar 3 870 000 pour soutenir la première étape : la partie mise au point d'une collection de pathogène et d'HE.

## Matériels et Methode

### Collecte des pathogènes

Des échantillons de fruits atteints de maladies post-récoltes dans 8 régions de Madagascar ont été collectés.

Nous sommes descendues nous-même sur le terrain pour collecter ces échantillons à Antsiranana (début Décembre 2013) , Mahajanga (mi- Décembre 2013), Analavory et Tsiroanomandidy (Fin Décembre 2013) et Toamasina (mi-Janvier 2014). Par contre, les échantillons de Tuléar (Mi-novembre 2013), de Manakara et de Mananjary (juillet 2013) ont été ramenés par des convoyeurs.

Le nombre d'échantillons collectées est établi sur place en fonction de la filière. Un échantillonnage a été fait au pied du fruitier et à différentes étapes de la filière commerciale.

### Extraction, isolement et purification des souches

Les souches fongiques présentes sur ces fruits ont été extraites immédiatement une fois dans nos laboratoires à Tananarive.

Pour ce faire, nous nous sommes inspirés de la methode de Abou-Zeid et al., 2008 (14).

Environ 4m<sup>2</sup> de peaux atteints de maladies post-récoltes est incubé à 28°C sur un milieu de culture fongique ajouté d'antibiotique, le gelose Sabouraud Chloremphénicol.

Les champignons qui ont poussés sont ensuite repiqués successivement sur un milieu sans supplément, le Potato Dextrose Agar, jusqu'à isolement total de chaque souches. Cela peut prendre une semaine à quelques mois.

Les souches étant isolés pouvant encore êtres sœurs ou cousines, une purification est necessaire. Cette étape consiste à isoler une spore unique que l'on cultivera et conservera par la suite à -80°C dans du glycérol 20%. C'est la méthode des monospores (15). Elle permet d'avoir une souche pure et stable que l'on peut étudier et tester par la suite.

### Collecte et analyse des HE

Nous avons commencé la collecte des huiles essentielles de *R. aromatica*. Actuellement, les l'exploitation de la filière HE de *R. aromatica* se fait pas des organisation paysannes locale appellées Vondron'Olonon Ifotony. Les huiles essentielles ont été commandées puis achetées auprès de ces sturctures qui établissent déjà primairement leur compositionn.

Cette analyse primaire a été effectuée auprès de l'IMRA par Chromatographie en Phase Gaseuse ou CPG. L'utilisation de cette methode pour l'analyse des HE de *R. aromatica* a déjà été rapportée par Andrianoelisoa en 2006 et 2010 (9-10).

## Résultats et Interpretations

### Collection d'HE

Des volumes différentes de 5 types d'HE de *R. aromatica* ont été collectées. La quantité maximale de 500 ml n'a pas pu être atteinte faute de disponibilité suffisante en feuilles. La composition majeure de ces HE sont présentée dans le tableau 1 et elle indique qu'on est en présence de 4 types d'HE : le chemotype limonène, le chemotype sabinène et le chemotype methyl chavicol. La dernière huile n'a pas fait l'objet d'analyse mais les feuilles utilisées pour son extraction proviennent d'arbres déjà repertoriés et dont l'HE a déjà fait l'objet d'analyse. On a donc des raisons de penser que c'est une HE de type à methyl chavicol.

Tableau 1 : Etats des lieux de la collection d'HE

Chémotype	Composition majeure	Quantité (ml)
Limonène (L)	Lim 40, ME 26.7, Linalol 8.4,	250
Methyl Eugenol (ME)	ME 71.1	240
	ME 72.8	160
Sabinène (S)	S 34, ME 13.7	160
	S 29, ME 12.3	90
Methyl Chavicol (MC)		600

### Collection de pathogène

A ce stade de notre recherche, on constate deux sources de variabilité en terme de souches fongiques rencontrées après recolte (cf tableau 2):

- Une variation en fonction du fruit source : les souches prélevées à partir des bananes est nettement montre une plus grande variabilité par rapport aux papayes et mangues malgaches. En effet, le nombre de type de souches fongiques isolées à partir des échantillons malades de bananes est très élevé par rapport au nombres de souches fongiques isolées à partir des échantillons de mangue ou de papaye collectées.
- Une variation en fonction de la zone de collecte : quelques soit le fruit source, le nombre de types de souches prélevées à partir des échantillons provenant de tamatave est plus élevée par rapport aux autres régions que nous avons choisis.

Tableau 2: Etats des lieux pour la mise au point d'une collection de pathogène malgaches

Zones de collecte		Côtes Est			Côtes Ouest		Sud	Hautes terres			Sous-total
		Mananjary	Manakara	Tamatave	Diego	Majunga	Tuléar	Arivonimamo	Analavory	Tsiroanomandidy	9
banane	Echantillons collectés	6	3	13	2	2	2	4			30
	Souches Isolées	44	5	90	6	6		12			157
	Souches purifiées et conservées	19	2	47	8	8		9			85
papaye	Echantillons collectés			6	1	1	2	3			12
	Souches Isolées			27	1	1	4	4			36
	Souches purifiées et conservées			10	3	3	4	3			20
mangues	Echantillons collectés				9	12	3	2		9	35
	Souches Isolées				11	14	4	2		9	40
	Souches purifiées et conservées				4	8	3	1		4	20
Totaux	Sous-total échantillons collectés	6	3	19	9	15	7	4	5	9	77
	Sous-total souches isolées	44	5	117	11	21	8	12	6	9	233
	Sous-total souches purifiées	19	2	57	4	19	7	9	4	4	125

## Difficultés rencontrées

D'énormes problèmes de contamination nous ont freiné dans notre étude. Il s'agit de souches inconnues fortement résistantes. Il nous faut constamment renouveler notre technique de stérilisation de la culture car ces souches envahissantes s'adaptent très vite à nos moyens de lutte. Elles continuent de ce fait à nous retarder dans l'avancement de nos travaux. Toutes fois, nous escomptons terminer la mise au point de toutes les collections (HE et pathogènes) avant notre séjour à La Réunion (à partir du 14 Septembre 2014).

## Conclusion et perspectives

Ainsi, nous pouvons dire en premier lieu que la composition majeure des Huiles essentielles que nous avons collectées sont en concordance avec la classification proposé par Andrianoelisoa et al., en 2006, 2010 et 2012 (9-11) pour la définition en chemotype. Il est important de marquer que de plus amples analyse **pour confirmer et préciser cette composition** est prévue prochainement par GC-MS ( chromatographie en phase gazeuse couplé à une spectrométrie de masse). Cela entre dans le cadre d'une mobilité que nous prévoyons pour septembre cette année à la Réunion.

En deuxième lieu, il ressort de nos résultats actuel que les bananes offrent de conditions plus propices au développement de flore fongique que les deux autres fruits que nous investiguons. Pourtant, ces trois fruits ont tous des teneurs élevées en eau, sucres. La différence se situe probablement dans la résistance intrinsèques de chaque fruit au développement fongique en son sein ou à sa surface (16-18).

On peut avancer l'hypothèse que les zones du côtes Est, du fait du fort taux d'humidité et de la forte température rencontrés dans cette zone (19-20), remplissent plus fortement que le sud ou l'ouest les conditions optimales de développement des souches fongiques.

A ce stade, nous ne sommes pas encore en mesure d'établir l'identité de nos souches, ni de définir quelle souche est à l'origine des maladies post-récoltes entraînant la pourriture accéléré des fruits.

La détermination de l'identité de chaque souche de notre collection par les méthodes de la biologie moléculaires est aussi programmé dans le cadre de la mobilité à La Réunion. Nous nous proposons aussi d'y tester l'aptitude de nos huiles essentielles à être toxiques pour chaque souche pathogène de notre collection ainsi que leur infection et leur développement sur nos fruits.

## Références bibliographiques

1. Molinillo M.G., R.M. Varela, J.C.G. Galindo and F.A. Mac.2007. Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*; 63:327–48.
2. Dayan F.E., C.L. Cantrell and S.O. Duke. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 17:4022–34.
3. Reigart J.R., J. R. Roberts and USEPA. 1999. Recognition and management of pesticide poisonings. Washington DC, US Environmental Protection Agency eds. 238 p.
4. Asian Productivity Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Postharvest Management of Fruit and Vegetables in the Asia-Pacific Region. 2006. p. 312.

5. Ratnadass A., P. Fernandes, J. Avelino and R. Habib . 2011. Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for Sustainable Development*; 32: 273–303.
6. Burt S.A. (2004). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. *International Journal of Microbiology*; 94:223–53.
7. Parolin P., C. Bresch, N. Desneux, R. Brun, A. Bout, R. Boll and C. Poncet . 2012. Pest Management Secondary plants used in biological control: A review. *International Journal of Pest Management*; 58:91–100.
8. Isman M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*; 19:603–8.
9. Andrianoelisoa H.S., C.Menut, P.C. De Chatelperron, P. Ramanoelina and P.Danthu . 2006. Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils from *Ravensara aromatica* Sonnerat , a tree endemic to Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*; (May):833–8.
10. Andrianoelisoa H.S., C. Menut, P. Ramanoelina, F. Raobelison, P.C. De Chatelperron and P. Danthu . 2010. Chemical Composition of Essential Oils From Bark and Leaves of Individual Trees of *Ravensara aromatica* Sonnerat. *Journal of Essential Oil Research*; 22:66–70.
11. Andrianoelisoa H, Menut C and Danthu P. (2012). *Ravensara aromatica* vs. Ravintsara: une confusion qui perdure parmi les distributeurs d'huiles essentielles en Europe et en Amérique du Nord. *Aromathérapie*, 10:161–9.
12. Razafimamonjison G., Jahiel M., Ramanoelina P .R., Fawbush F. And Danthu Pascal. (2013). Effects of phenological stages on yield and composition of essential oil of *Syzygium aromaticum* buds from Madagascar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2: 312-318.
13. Razafimamonjison G., M. Jahiel, T. Duclos, P. Ramanoelina, F. Fawbush and P. Danthu . 2013. Bud, leaf and stem essential oil composition of clove ( *Syzygium aromaticum* L .) from Indonesia , Madagascar and Zanzibar. *Natural Product Communications*. (sous presse).
14. Choi Y.W., Hyde K.D. and Ho W.H. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 3 : 29-38.
15. Abou-Zeid A.M., Altalhi, A. D. and Abd El-Fattah, R.I. 2008. "Fungal Control of Pathogenic Fungi Isolated From Some Wild Plants in Taif Governorate , Saudi Arabia". *Malaisian Journal of Microbiology*, 4 : 30–39.
16. Sugiura K. and S. R. Benedict. 1918. The nutritive value of the banana. *Journal of Biological Chemistry*, 36:171-189.
17. Saranwong S., Sornsrivichai J. and Kawano, S. 2004. Prediction of ripe-stage eating quality of mango fruit from its harvest quality measured nondestructively by near infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 31 : 137-145.
18. The nutritive value of papaya' Miller C. D. And Robbins R.C. 1937. *Biochemistry*, 31: 1-11.
19. Donque G. 1972. *The climatology of Madagascar*.(pp. 87-144). Springer Netherlands.
20. Arivelo T. A., Ratiarison A., Bessafi M. and Ramiharijafy, R. 2007. Madagascar rainfall climatology: Extreme Phenomena. Stanford University, *Third High-Energy Physics International Conference*.