

Rapport Final d'Exécution

19 Avril 2021

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

Responsable scientifique : Dr Alba Zaremski

CIRAD, UMR AGAP Institut, F-34398 Montpellier, France
UMR AGAP Institut, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, F-34398 Montpellier, France
CIRAD-Campus Agronomique de Kourou- BP 701-97387 Kourou Cedex



Financement

Ce projet a été cofinancé par l'Union Européenne.

Montant du projet : 943 721.39€

Participation Fonds européen de développement régional (FEDER) : 581 022.56 €

Participation Collectivité Territoriale de Guyane (CTG) : 129 582.00 €

Participation Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) : 217 427.52 €

Participation Guyane Développement Innovation (GDI) : 15 689.32€

N°SYNERGIE : GY0012075

N° Administratif du dossier FEDER/2017/N°31

Chef de file : CIRAD

Partenaires : Guyane Développement Innovation (GDI)

Intitulé de l'Opération : AQUILARIA

AP 01 – Encourager la recherche appliquée, les expérimentations et le développement des entreprises

OS02 – Augmenter l'innovation des entreprises et le transfert de l'innovation en direction des entreprises dans les domaines d'action stratégiques de la SRI-SI

Période d'éligibilité des dépenses : du 01/01/2017 au 30/04/2020

Période d'exécution de l'opération : du 01/01/2017 au 31/12/2020

Le projet Phase 2 Aquil@Guyane arrive à son terme.

L'ensemble de l'équipe du projet s'est mobilisée pour apporter des solutions concrètes pour la création d'une filière d'huiles essentielles d'Aquilaria et de produits dérivés en Guyane, afin de contribuer au développement économique et au rayonnement du territoire.

La phase 3 de ce projet Aquil@Guyane, en cours de finalisation, consistera en la mise en place d'une filière Agarwood en Guyane. Ce sera la préparation du dispositif de production industrielle des huiles essentielles d'Agarwood ou de bois sain et de poudre de feuilles « infusion-santé ».

La qualité devra répondre à l'excellence demandée par les professionnels et pourra faire l'objet d'un Label « Guyane ». Cette phase, centrée sur la recherche à la suite des phases précédentes, devra faire le lien entre la recherche et la mise en production agricole industrielle. Cette phase 3 a vocation à élargir l'accès à la culture d'Aquilaria à de nouveaux agriculteurs guyanais afin de développer une véritable filière à court terme sur le territoire. La mise en place de cette filière en Guyane devra se faire comme dans la phase 2 sur la base d'une collaboration avec le Laos, avec des échanges scientifiques intenses.

L'objectif de cette phase 3 est de passer véritablement de la recherche scientifique vers la production. Par ailleurs, la protection de la biodiversité de l'environnement naturel et le respect du partage et des avantages sont au centre de nos préoccupations pour la poursuite de ce projet.

Au cours de cette 2^{ème} phase, la CTG s'est rapprochée de la Cosmetic Valley. Ce rapprochement devra permettre l'ouverture vers des débouchés industriels locaux et internationaux pour les productions.

Avenants

Le contrat initial a fait l'objet de deux avenants.

- Pour l'Avenant N°1, le comité de Programmation Européen a émis un avis favorable le 11 juillet 2019.
- Pour l'Avenant N°2, le comité de Programmation Européen a émis un avis favorable le 29-05-2020.

Cinq comités de pilotage se sont tenus durant la phase 2 du projet Aquil@Guyane. L'objectif de ces comités était de faire le point sur l'état d'avancement et de prendre les décisions relatives au bon déroulement du Projet.

Le bilan final de la phase 2 Aquil@Guyane a été présenté le 1^{er} décembre 2020 durant les Assises de l'Agriculture en Guyane organisées par la Collectivité Territoriale de Guyane (CTG) et Guyane Développement Innovation (GDI).

Figurent ci-dessous les liens de ces actions réalisées :

- 1- Lancement du projet en 2017. Création d'une filière d'huiles essentielles en Guyane à partir de l'arbre Aquilaria ; <https://la1ere.francetvinfo.fr/guyane/creation-filiere-huiles-essentielles-guyane-partir-arbre-aquilaria-627344.html>;
- 2- Comité de pilotage du 10 septembre 2018 ; *Guyane, 10 septembre 2018 : La CTG accompagne un projet de production de bois d'Aquilaria, un arbre aux nombreuses vertus médicinales* ;
- 3- Comité de pilotage du 18 janvier 2019 : Restitution de l'Étude de Faisabilité de la mise en place d'une Filière d'Huiles Essentielles d'Aquilaria en Guyane *voir productions scientifiques* ;
- 4- Comité de pilotage du 6 février 2020- *Projet Aquil@Guyane : présentation du bilan de la phase 2 en comité de pilotage à Cacao*
- 5- Comité de pilotage du 22 octobre 2020. Restitution de l'Étude de Faisabilité de la mise en place d'une Filière d'Huiles Essentielles d'Aquilaria en Guyane.
- 6- Bilan de la phase 2 Aquil@Guyane présenté aux Assises de l'Agriculture : <https://aquilaria.cirad.fr/content/download/4407/32467/version/4/file/Les+assises+de+l%27agriculture+Guyane+2020.pdf>

Problèmes rencontrés pendant la réalisation de l'opération

[Dans le cadre des APA et du Protocole de Nagoya.](#)

Ce n'est qu'après un grand nombre de courriers échangés avec les autorités locales et plusieurs déplacements effectués au Laos, que nous avons obtenu les autorisations de récolte de graines, de feuilles et de bois d'Aquilaria.

En effet, à plusieurs reprises, les organismes laotiens qui nous avaient été désignés comme nos partenaires ont été remplacés par d'autres organismes, ce qui a engendré de grands retards dans nos négociations pour l'obtention des signatures des protocoles d'accord spécifiques à la thématique Aquilaria (SMOU ou SMOA). Ces accords ont vocation à formaliser les actions de coopération entre le Cirad, la Faculty Forestry Scientific (FFS) et l'Université Nationale du Laos (NUOL).

Comme il a été signalé aux Comités de Pilotage des 11 Septembre 2018 et 19 janvier 2019, nous avons été dans l'obligation de modifier la répartition entre les lignes budgétaires, sans changement du budget initial du projet,

pour finaliser la mise en œuvre des procédures APA avec le Laos et renforcer les liens avec les diverses institutions du Laos telles que le Ministère de l'Agriculture, le Ministère des Sciences et Technologies et l'Université National du Laos. Suite à notre demande, le comité de Programmation Européen a émis un avis favorable le 11 juillet 2019 : Avenant N°1.

Dans le cadre de la pandémie de la COVID-19

Depuis le 5 mars 2020, dans le contexte de confinement national lié à l'épidémie du Covid-19, il ne nous a pas été possible d'assurer les déplacements qui étaient envisagés et de procéder à la clôture budgétaire de l'opération. C'est dans ce contexte sanitaire contraint que le Cirad a demandé la possibilité d'un report de nos missions qui n'ont pas pu se réaliser et qui ne se feront pas dans les mois à venir notamment au Laos.

Suite à notre demande, le comité de Programmation Européen a émis un avis favorable le 29-05-2020 : Avenant N°2.

Remerciements

Cette phase 2 Aquil@Guyane a pu être réalisée grâce au co-financement de l'Europe (Le Fonds européen de développement régional, FEDER), la Collectivité Territoriale de Guyane (CTG), Guyane Développement Innovation (GDI) et le CIRAD., Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. Tous nos remerciements à ces acteurs qui ont su s'impliquer en tant que de besoin.

Nous tenons à remercier particulièrement les agriculteurs Madame Sue Hu, 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 d'assister les scientifiques lors des essais en champs.

Les livrables attendus sont définis dans l'Annexe 1 de la Convention : « *Fiche synthétique de l'opération* » et en page 5 de l'Avenant N°2 0 LA Convention Réf.SYNERGIE / GY0012075/ :

- **Guide de bonnes pratiques pour la gestion, les échanges et la valorisation de ressources génétiques partagées avec des partenaires internationaux : règles d'échanges, modes de partage des avantages et perspectives d'échanges élargies pour la région.**

Le guide a été réalisé. Il s'appuie notamment sur les comptes-rendus des réunions associant les autorités et les scientifiques du Laos, les comptes-rendus des missions des scientifiques du Cirad et le Guide de la mise en œuvre de l'APA pour les CRBs.

Ce guide s'intitule : « *Guide pratique : mise en œuvre de l' Accès et Partage des Avantages, APA, dans les relations avec le Laos* ». Il peut être consulté sur la base de données du Cirad.

- **Des plantules d'Aquilaria en pépinière**

Le pépiniériste, Mr Hu Ya, localisé à Cacao, associé au projet Aquil@Guyane cultive des plantules d'Aquilaria en pépinière. Ces plantules sont mises à disposition aux agriculteurs qui en font la demande.

- **Des plantules d'Aquilaria en plantation**

Les plantules d'Aquilaria ont été mis en plantation dans les parcelles de Cacao et de Régina, des agriculteurs associés au projet Aquil@Guyane. Les arbres atteignent aujourd'hui des hauteurs avoisinant 10 mètres.

- **De la poudre de feuilles d'Aquilaria**

De la poudre de bois d'Aquilaria a été produite à échelle du laboratoire. Cette poudre aura vocation à être utilisée en tisannerie lorsqu'elle sera produite en quantité suffisante.

- **De l'huile essentielle haut de gamme**

De l'huile essentielle haut de gamme a été produite à échelle du laboratoire. Cette huile essentielle aura vocation à être utilisée en cosmétologie et en parfumerie lorsqu'elle sera produite en quantité suffisante.

- **Des champignons pour la production de bois contaminé**

Les champignons issus des sols de Guyane ont été sélectionnés et utilisés pour la production d'agarwood (Cf. à partir de la page 25 de ce présent rapport).

- **Des publications**

Les publications réalisées lors de cette phase du projet Aquil@Guyane sont listées à partir de la page 46 de ce présent rapport.

- **Résultats sur les débouchés économiques de cette filière**

Une étude économique intitulée : « *Étude de faisabilité économique et étude des facteurs permettant la mise en place d'une filière d'huiles essentielles d'Aquilaria en Guyane selon une échelle micro et macroéconomique* » a été réalisée par Guyane Développement Innovation ainsi qu'évoquée en page 42 de ce présent rapport.

Vous trouverez dans ce rapport les principales actions qui ont été réalisées du 1^{er} janvier 2017 au 31 décembre 2020. Tous les documents (compte-rendu, rapports, publications, mémoires, Etc...) sont à disposition sur simple demande et une partie des résultats du projet sont disponibles sur le site web du projet Aquil@Guyane: <https://aquilaria.cirad.fr/>



Sommaire

I. DESCRIPTION DU PROJET	7
II. PRINCIPALES ACTIONS REALISEES	10
1- Le respect des textes	11
2- Le dispositif expérimental	14
3- Les actions scientifiques	18
3.1. Récolte de feuilles dès les plus jeunes stades de développement afin d'analyser l'évolution de leur structure phytochimique dans le temps, en vue de leur valorisation.	18
3.1.1. Référencement des arbres sur la parcelle d'étude de Cacao (surface 6 hectares)	18
3.1.2. Identification des espèces d' <i>Aquilaria</i> du dispositif expérimental	18
3.1.3. Récolte de feuilles fraîches, sèches, matures et juvéniles pour leur étude phytochimique.	19
3.1.4. Etude de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles (analyse en chromatographie en phase gazeuse, GC/MS) en fonction des espèces, du terroir (Régina et Cacao) et du mode de contamination de l'arbre	20
3.2. Pour une production contrôlée d'agarwood d' <i>Aquilaria crassna</i> : approches métagénomique, biochimique et histologique	23
3.2.1. Phase 1- Caractérisation des communautés fongiques présentes dans les arbres d' <i>Aquilaria</i> : Quelles sont les communautés fongiques associées aux <i>Aquilaria crassna</i> de Guyane ?	25
3.2.2. Phase 2- Caractérisation moléculaire de champignons lignivores de Guyane	28
3.2.3. Phase 3- Evaluation de deux méthodes d'induction pour la production d'agarwood	30
3.2.3.1. Première Méthode d'induction testée en Guyane : Inoculations de champignons environnementaux par application de sol ou non sur une blessure de surface sur les arbres en champs	30
3.2.3.2. Deuxième méthode d'induction testée en Guyane : Induction par inoculation de 7 souches pures de champignons de Guyane	32
3.2.4. Phase 4- Evaluation de la composition chimique des huiles essentielles obtenues après les deux méthodes d'induction pour la production d'agarwood.	34
3.2.5. Phase 5- Capacité des cellules de cals d' <i>A. crassna</i> à produire de l'agarwood après inoculation de champignon, en laboratoire	39
3.2.6. Phase 6 : Développement à venir : Utilisation de la spectrométrie proche infrarouge (SPIR) pour différencier les « qualités » des agarwoods	40
4. Les actions économiques : Étude de faisabilité économique et étude des facteurs permettant la mise en place d'une filière d'huiles essentielles d' <i>Aquilaria</i> en Guyane selon une échelle micro et macroéconomique.	42
5. Promotion et communication du projet Aquil@Guyane sur le territoire guyanais	46
III. PERSPECTIVES	52

I Description du projet

Le présent projet répond à la demande d'un groupe d'agriculteurs de Guyane de pouvoir cultiver les arbres du genre *Aquilaria* (originaire d'Asie du Sud Est) dont l'oléorésine contenue dans le bois et les molécules contenues dans les feuilles présentent une valeur économique élevée.

Le bois d'*Aquilaria*, blessé ou contaminé par un pathogène, notamment un champignon, produit en réponse au stress une oléorésine intensément odorante, très parfumée et de grande valeur ajoutée, (ce bois contaminé est appelé alors « Agarwood »). Le prix du litre d'huile essentielle obtenue après distillation de ce bois est en moyenne de 10 000\$ sur le marché international. Pour ses propriétés médicinales, cette oléorésine est également utilisée en médecine traditionnelle chinoise, tibétaine et ayurvédique. Cet Agarwood est aussi utilisé pour la fabrication d'encens, le prix pour un encens de qualité est d'environ 1 000\$ le kg.

Ces dernières années, un engouement pour l'infusion de feuilles séchées d'*Aquilaria* a vu le jour, notamment en Corée du Sud, au Japon et au Vietnam. Ces feuilles ont des propriétés médicinales intéressantes, dues aux dérivés polyphénoliques qui peuvent être exploitées sous forme d'Infusion-santé ; au Vietnam, 30 sachets de 0,5gr de poudre sont vendus 20\$. En vue de leur valorisation, des analyses des substances naturelles de ces feuilles seront effectuées en fonction de plusieurs paramètres : âge de la plante, conditions environnementales (peuplements purs ou en mélange), terroirs et saisons.

Par ailleurs la Genkwanine, polyphenol contenu dans les feuilles, pourrait éliminer le mercure fixé dans l'organisme. Si avérée, cette propriété pourrait être d'un grand intérêt dans le contexte de l'orpaillage en Guyane.

L'objectif de ce projet est de fournir aux agriculteurs de Régina et de Cacao les connaissances fondamentales nécessaires à la mise en place d'une filière de production durable de feuilles et de bois d'*Aquilaria* transformé en Agarwood (bois contenant de l'oléorésine oxydée) à distiller, après avoir levé les verrous techniques et réglementaires.

Il convient de dire que ce projet est la deuxième phase du projet Aquil@Guyane.

La première phase a eu pour objectif principal la mise en place du dispositif expérimental à Régina et à Cacao. Ce dispositif expérimental de 11 hectares de plantations d'arbres d'*Aquilaria* a été réalisé grâce à un financement incitatif dans le cadre du programme opérationnel FEDER de l'objectif Convergence (2007-2013).

La deuxième phase, qui fait l'objet du présent rapport, concerne la détermination des bases scientifiques et techniques pour la création d'une filière de production d'huiles essentielles d'« *Aquilaria* (Agarwood) » haut de gamme et de produits dérivés, en Guyane.

Cette deuxième phase de travail se décompose en deux axes : 1) la production de bois contaminé par un champignon ou agressé destiné à la distillation et 2) l'exploitation des feuilles pour la production de sachets d'infusion-santé.

Dans ce projet, la culture d'*Aquilaria* en Guyane se fera sans fertilisant, grâce à une couverture végétale riche en azote et en mélange avec des espèces aromatiques notamment des agrumes.

Ce programme de recherche débouchera sur une action post FEDER qui consistera en la mise en place d'une filière « Agarwood » en Guyane : préparation du dispositif de production industrielle des huiles essentielles

d'Agarwood et de poudre de feuilles « infusion-santé ». La qualité devra répondre à l'excellence demandée par les professionnels et pourra faire l'objet d'un Label « Guyane ».

Le projet Aquil@Guyane est composé d'une tâche préliminaire et de 6 tâches, sur une période de 3 ans : du 1^{er} janvier 2017 au 31 décembre 2020.

Les tâches du projet Aquil@guyane

Tâche préliminaire

Mise en place d'un cadre juridique entre les partenaires ;
Détermination des modalités d'Accès aux Ressources Génétiques (RG) et d'un Partage des Avantages entre la Guyane et le Laos (producteur des graines d'*Aquilaria*).

Première tâche

Poursuite de la mise en place des plantations :
Préparation des plantules en pépinière et dispositif afin de déterminer les conditions de croissance optimale à Cacao et Régina.

Deuxième tâche

Récolte de feuilles dès les plus jeunes stades de développement afin d'analyser l'évolution de leur structure phytochimique dans le temps, en vue de leur valorisation.

Troisième tâche

Étude des champignons de Guyane susceptibles d'être associés à la contamination du bois d'*Aquilaria* : analyses comparatives des huiles essentielles obtenues en fonction de la contamination et l'âge du bois.

Quatrième tâche

Étude des rendements et de la qualité des huiles essentielles obtenues expérimentalement en fonction de la taille de l'arbre, du terroir, du contexte écologique et du traitement des arbres (élagage, blessures, etc.)

Cinquième tâche :

Étude de faisabilité économique d'une filière de production durable de bois d'*Aquilaria* en Guyane.

Sixième tâche

Promotion et communication institutionnelle du projet Aquil@Guyane sur le territoire guyanais.

Le Partenariat du projet Aquil@guyane

Aujourd'hui, la structure porteuse de ce projet est constituée de la Collectivité Territoriale Guyane, de Guyane Développement Innovation (GDI), du Cirad, de certains membres de l' « Association des Producteurs d'*Aquilaria*, de plantes à parfums et aromatiques de Guyane (AquiPaG) ».

Ces partenaires sont les principaux acteurs impliqués en permanence au cours du développement de ce projet.

- La Collectivité Territoriale Guyane, CTG, qui participe au financement, est impliquée dans les échanges avec le Laos et aide à la mise en œuvre administrative, juridique et technique du projet, notamment à travers les

conseils dispensés.

- Le Cirad participe au financement, pilote l'opération et met à disposition son appui et transfert scientifique à travers ses connaissances, ses laboratoires, ses agents.
- Les agriculteurs de Cacao et de Régina de Guyane impliqués dans ce projet sont Mme Sue HEU, installée à Cacao, exploitante agricole et Mrs Didier TCHA, installé à Régina, exploitant agricole ; Pierre Tcha, installé à Régina, exploitant agricole ; Hu Ya, titulaire d'un agrément de pépiniériste, demeurant à Cacao ; il est le fournisseur officiel de plantules d'*Aquilaria* auprès des cultivateurs désireux de s'impliquer.
- Guyane Développement Innovation (GDI) met en place, en lien étroit avec le Cirad une étude sur la faisabilité économique, en partenariat avec les équipes d'économistes et les acteurs privés. GDI veille également au soutien technologique de cette filière via les projets d'infrastructures que porte la structure. Ce projet bénéficie de l'expertise de GDI dans le cadre de la mise en place de son pôle qualité, dont les actions visent notamment la protection et le respect de la biodiversité.

Les Universités de Guyane et du Laos, sont un support au caractère scientifique et novateur du projet.

La Direction Générale des Territoires et de la Mer – Direction de l'Agriculture de l'Alimentation et des Forêts de Guyane (DGTM-DAAF) apporte ses conseils et recommandations pour la mise en place d'un système de cultures en agro forêts dans le respect de l'environnement.

La Chambre d'agriculture travaille en concertation avec les agriculteurs de Régina et de Cacao.

Relations avec le Laos :

Ce projet s'inscrit dans une démarche d'exemplarité et d'éthique.

Dans le projet AQUILARIA, les activités de recherche et de développement ayant recours à un accès aux ressources génétiques nécessitent la mise en œuvre du protocole de Nagoya.

Les relations avec le Laos ont pour objet, dans la continuité des actions menées avec succès durant le projet, de maintenir et de renforcer les relations avec le Laos sur la détermination des modalités d'Accès aux Ressources Génétiques et le Partage des Avantages entre la Guyane et le Laos. Cette action se réalise, dans un sens comme dans l'autre, pour le partage des connaissances et savoir-faire en matière de plantations, de culture et de collecte des produits de l'arbre aquilaria (feuilles, graines, bois, ..). Le partage s'organise dans le respect des textes internationaux relatifs au partage des avantages : la Convention sur la Diversité Biologique, adoptée le 22 mai 1992 et entrée en vigueur le 29 décembre 1993, le Protocole de Nagoya adopté le 29 octobre 2010, et entré en vigueur le 12 octobre 2014, le règlement européen (2014) entré en vigueur en 2015, et la loi française adoptée le 20 juillet 2016.

Les échanges de ressources génétiques et échanges d'informations se développeront au cours du projet, y compris par le retour des résultats des expérimentations de Guyane vers les partenaires du Laos notamment l'Université National du Laos (NUOL/FFS), et/ou d'autres instituts comme le Biotechnology and Ecology Institute (B.E.I.).

Les Principes horizontaux de l'Union Européenne

L'opération prend en compte les principes horizontaux de l'Union européenne, de manière directe, indirecte. Ces principes sont les suivants :

Egalité femmes-homme

Au même titre que pour la création d'emploi, le projet Aquil@Guyane s'engage dans sa mise en œuvre à

promouvoir l'égalité des chances et à favoriser la mixité des personnes inhérentes au projet.

A ce titre, le projet a été coordonné par une femme (Alba Zaremski, CIRAD), et les recrutements induits à la mise en œuvre du projet se sont appuyés sur un ratio homme/femme équilibré pour respecter les principes de l'égalité des sexes. A titre d'exemple, les études phytochimiques, mycologiques, économique, la culture d'Aquilaria et la partie des APA ont été en partie réalisées par six femmes.

Egalité des chances et non-discrimination

Dans ce projet il n'y a pas de discrimination fondée sur le sexe, la race ou l'origine ethnique, la religion ou les convictions, le handicap, l'âge ou l'orientation sexuelle lors de l'élaboration et de la mise en œuvre des programmes.

Développement durable

Les personnels dédiés à la mise en œuvre de ce projet se sont engagés à minimiser leurs impacts négatifs sur l'environnement à travers leurs gestes quotidiens. Ainsi, la culture en agro-forêts a été privilégiée afin de limiter les intrants chimiques et de favoriser les pratiques respectueuses de l'environnement.

Par ailleurs, il a été mis en place dans chaque lieu du projet (laboratoires, bureau, aux champs, etc.) différents bacs pour les déchets, afin d'assurer un recyclage efficace.

De même, la réduction de l'utilisation de papier ainsi que des transports polluants, ont été des facteurs pris en compte par l'ensemble du personnel. Pour cela les outils par voies électroniques (email, visio conférence, etc.) ont été préférés.

II Principales actions réalisées

Sont présentées les principales actions réalisées depuis le 1er janvier 2017 jusqu'au 31 décembre 2020. Elles sont présentées en cinq parties ;

- 1- Le respect des textes : page 9
- 2- Le dispositif expérimental : page 12
- 3- Les actions scientifiques : page 16
- 4- Les actions économiques : page 40
- 5- Promotion et communication : page 42

1. Le respect des Textes.

Partenaires : CTG, Cirad, Agriculteurs, experts

Mise en place d'un cadre juridique entre les partenaires ;

Détermination des modalités d'Accès aux Ressources Génétiques (RG) et d'un Partage des Avantages entre la Guyane et le Laos (producteur des graines d'Aquilaria)

Le genre *Aquilaria* et les textes

Le genre *Aquilaria* est inscrit dans l'Annexe II de la CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 2005) en tant qu'espèce qui, bien que n'étant pas menacée d'extinction, pourraient le devenir si le commerce des spécimens de ces espèces n'était pas soumis à une réglementation stricte ayant pour but d'éviter une exploitation incompatible avec leur survie.

La CITES réglemente le commerce des espèces de l'Annexe II, et donc l'exportation de l'huile et des extraits d'Agarwood sera soumise à la délivrance d'un permis délivré par les autorités compétentes guyanaises. La CITES autorise l'importation et l'exportation des graines ou des feuilles d'*Aquilaria* notamment pour favoriser la conservation des espèces considérées.

S'agissant de l'introduction de ces espèces qui sont nouvelles pour la Guyane, les aspects réglementaires de protection des végétaux relèvent de la DGTML (anciennement Direction de l'environnement, de l'aménagement et du logement et Direction de l'Agriculture et des Forêts de Guyane) et de la Chambre d'Agriculture. Ces aspects réglementaires ont été discutés et ne soulèvent pas de problème administratif particulier.

- La Direction de l'ONF a donné son accord pour la mise en place, à titre expérimental, de plantations.
- Le Document CERFA- N° 15786*01 « Protocole relatif à la convention sur la diversité biologique adopté à Nagoya le 29 octobre 2010 ; Articles R. 412-12 à R. 412-16 du code de l'environnement » a été complété, et adressé le 9 avril 2018 au Ministère chargé de l'environnement. Il a été donné récépissé du dossier le 30 mai 2018, sans remarque.
- Le 1 juin 2018 et le 27 juin 2019, la Direction de l'Environnement de l'Aménagement et du Logement (DEAL) a répondu à notre demande du 6 mars 2018 et du 18 juin 2019 concernant la réglementation relative aux espèces protégées dans le cadre du projet FEDER Aquil@Guyane. L'annotation #1 4 de l'annexe 11.B précise : "Les graines ainsi que les plantules obtenues in vitro en milieu solide ou liquide et transportées en conteneurs stériles", ne sont pas concernés par l'inscription à cette annexe depuis le 02 janvier 2017.

L'Accès aux ressources génétiques (RG), aux connaissances traditionnelles associées (CT) et le Partage des Avantages en Guyane (APA)

Le projet porte sur une ressource génétique en provenance du Laos, l'*Aquilaria*, dont l'utilisation s'effectue, en lien avec des champignons guyanais identifiés, sur le territoire de la Guyane.

L'accès aux ressources génétiques et aux connaissances traditionnelles associées, et les modalités de leur utilisation sont soumis aux réglementations internationales, européennes et nationales en vigueur : la Convention sur la Diversité Biologique (CDB), adoptée le 22 mai 1992 et entrée en vigueur le 29 décembre 1993, le Protocole de Nagoya (PN) adopté le 29 octobre 2010, et entré en vigueur le 12 octobre 2014, le règlement européen (2014) entré en vigueur en 2015, et la loi française adoptée le 20 juillet 2016.

À l'aune de ces textes, Le Cirad s'inscrit dans une démarche d'exemplarité et d'éthique, et souhaite mettre en œuvre un cadre de partage des avantages pour ce projet.

Les activités de recherche et de développement ayant recours à un accès aux ressources génétiques nécessitent

la mise en œuvre du protocole de Nagoya.

Le Cirad s'investit dans ses projets dans le respect de l'esprit du Protocole. Il est soucieux que l'accès aux ressources génétiques dans les pays fournisseurs s'opère en concertation avec les partenaires locaux, de sorte que l'utilisation de ces ressources permette le partage des avantages (APA) au profit des différents acteurs, en particulier ceux de la recherche. Le Cirad privilégie les relations avec les acteurs de la recherche susceptibles d'être intéressés par la production des connaissances générées par ces projets.

Procédures et autorisations pour mener à bien nos activités de recherche dans le cadre des APA (Accès et Partage des Avantages).

Durant la phase 2 du projet, selon Madame Kongchay Pimmakoung, point focal des APA au Laos et Director of Biotechnology and Ecology Service Center, Biotechnology and Ecology Institute (B.E.I.), Ministry of Science and Technology (MOST), il convenait d'obtenir les signatures de deux documents intitulés : Research Collaboration Agreement et M.T.A. pour réaliser au Laos des collectes de matériel végétal (graines, feuilles et échantillons de bois d'Aquilaria).

Le 10 mai 2019, nous avons obtenu la signature de ces deux documents relatifs à notre collaboration avec le Laos. Ces deux documents, concernent les protocoles d'accord suivants : 1) le Specific Memorandum of Agreement « SMOA » : ce document formalise les actions de coopération entre le Cirad et la Faculty of Forestry and Science « FFS » de l'Université Nationale du Laos « NUOL » ; 2) le Material Transfer Agreement « MTA » : ce document formalise les échanges de matériel végétal.

Pour conclure ces actions, le certificat de conformité reconnu à l'échelle internationale (IRCC) nous a été accordé. Ce certificat sert de preuve de la décision des parties d'accorder un permis au demandeur. Le Ministère de la science et de la technologie du Laos (MOST), en tant qu'autorité compétente en vertu du Protocole de Nagoya, a publié en ligne l'IRCC dans l'Access and Benefit Sharing Clearing Sharing House (ABSCH) (<https://absch.cbd.int/>) le 28 Juin 2019 sous la référence ABSCH-IRCC-LA-246660-1.

Suite à l'obtention de ces autorisations, toujours dans le cadre du Protocole de Nagoya, une collecte de matériel végétal (graines et feuilles) s'est effectuée au Laos avec des scientifiques du Laos durant le mois de juillet 2019.



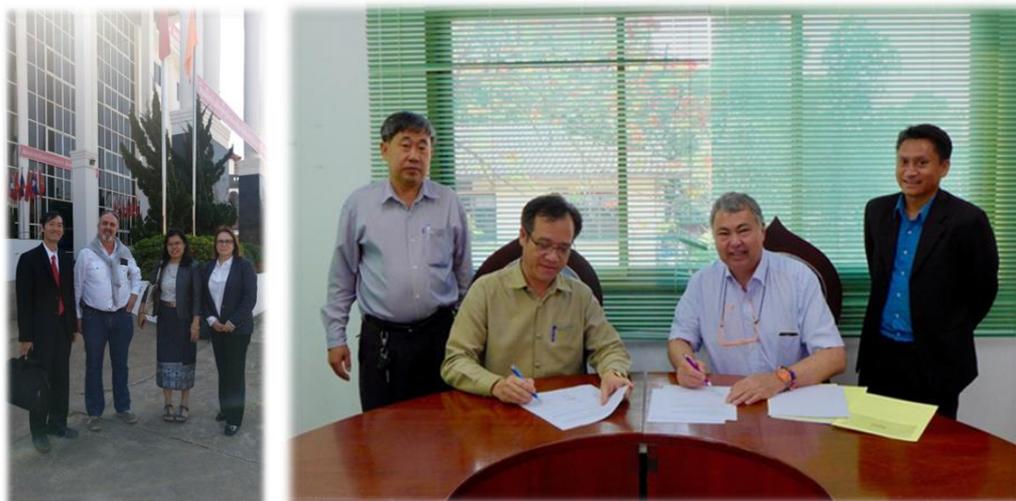
*La Collecte de matériel végétal Aquilaria au Laos (à droite),
Obtention du Certificat phytosanitaire au Ministère de l'Agriculture et des Forêts, « Plant Quarantine » du
Department of Agriculture (DOA) » (à gauche).*

Conclusion générale des relations avec le Laos

Dans le projet Aquil@Guyane, les échanges entre utilisateurs et fournisseurs des ressources génétiques ont pu mettre en œuvre concrètement des modalités d'APA.

Le projet Aquil@Guyane peut ainsi poser les bases d'une démarche pilote pour des projets similaires.

Un document intitulé : « Les relations avec le Laos : Guide des pratiques » reprend toutes les actions et démarches effectuées auprès du Laos. Ce guide permettra au lecteur de comprendre la complexité du pays et la façon de procéder pour lever les verrous culturels et institutionnels notamment au Laos, dans le cadre du Protocole de Nagoya.



Réunions de travail et signatures des documents officiels avec les Autorités du Laos et le Cirad

Production scientifique liée à cette partie du rapport

*Guide pratique : mise en œuvre de l'Accès et Partage des Avantages, APA, dans les relations avec le Laos.
Zaremski A, Leroy T, Ducouso M, Zaremski C, Michaloud G, Cao Van P (2020).*

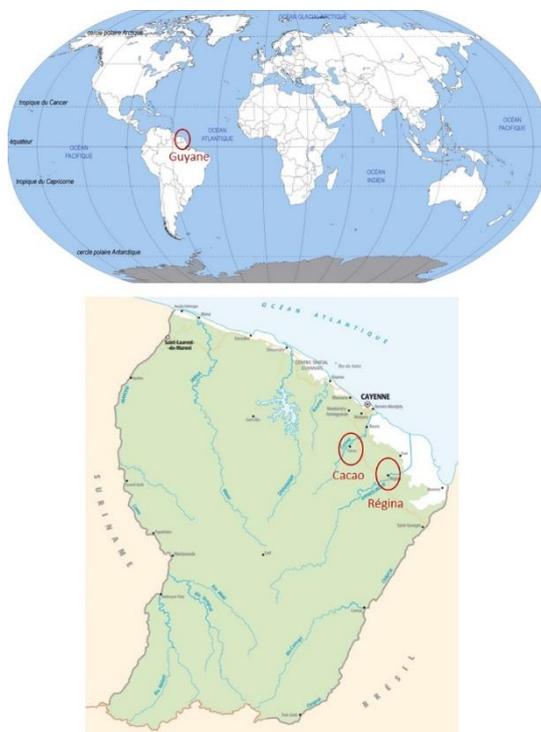
2. Le dispositif expérimental.

Partenaires : agriculteurs, experts, Cirad Poursuite de la mise en place des plantations :

Préparation des plantules en pépinière et dispositif afin de déterminer les conditions de croissance optimale à Cacao et Régina

Les dispositifs expérimentaux sont situés en Guyane française, dans le village de Cacao et la commune de Régina. Ces villages sont principalement habités par des ressortissants 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). Hormis les forêts à proximité des cours d'eau potentiellement, les deux villages présentent une forêt de plaine, en pente douce, bien drainée, sur sol argileux. En revanche, leurs caractéristiques géomorphologiques divergent avec un sol sableux et fluviomarín pour Régina et un sol alluvionnaire et granitique pour Cacao. 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).



Les champs expérimentaux de plantations d'Aquilaria en Guyane se trouvent à Cacao et Régina.

Les arbres du genre *Aquilaria* utilisés dans cette étude sont issus d'une plantation expérimentale. Les arbres ont été plantés en Janvier 2014 (Cf Rapport *Aquilaria*, 2015).

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 pintoï* Krapov. & W.C. Greg. Nous avons divisé le champ de Cacao en trois parcelles (ou blocs) sur la base de leur topographie. 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 (Cf. Rapport Aquilaria, 2015). Les arbres des parcelles B et C proviennent de graines originaires du Laos. (Cf. ci-dessous).



Vue aérienne de la plantation d'aquilaria à Cacao

Les arbres d'Aquilaria sont plantés en alternance avec des agrumes principalement des mandariniers .



Le sol est recouvert d'une Fabaceae fixatrice d'azote, l'*Arachis pintoï*,



La parcelle de Mr Hu Ya à Cacao : 6ha

Le champ de Régina, de surface 2 Ha de Mr Pierre Tcha; environ 500 arbres par Ha, correspond à une seule parcelle, la parcelle P. Le sol est recouvert d'une fabacée du genre *Desmodium* (Cf. ci-dessous).



Vue aérienne de la plantation d'aquilaria à Régina



Le sol est recouvert d'une Fabaceae fixatrice d'azote, du genre *Desmodium*



Le champ de Régina, de surface 3 Ha de Mr Didier Tcha; environ 500 arbres par Ha, correspond à plusieurs parcelles. Les arbres d'*Aquilaria* sont plantés en alternance avec des agrumes, principalement des mandariniers et le sol est recouvert d'une fabacée du genre *Desmodium*.



La pépinière des Aquilaria à Cacao



- a. *Aujourd'hui, les arbres d'Aquilaria des plantations expérimentales atteignent environ 10 mètres de haut.*
- b. *Les feuilles matures sont vert foncé avec une cuticule brillante et de forme elliptique.*
- c. *Les fleurs sont petites, jaunes et regroupées en inflorescences velues.*
- d. *Les fruits sont des capsules à deux valves, comportant une à deux graines, suspendues à un cordon.*

Production scientifique liée à cette partie du rapport

Sue Hu, Didier Tcha, Pierre Tcha, Hu Ya, Zaremski A (2020) Rapport : Contribution des agriculteurs de Régina et de Cacao dans la mise en place de la filière Aquilaria en Guyane. 60 p.

3. Les actions scientifiques.

3.1. Récolte de feuilles dès les plus jeunes stades de développement afin d'analyser l'évolution de leur structure phytochimique dans le temps, en vue de leur valorisation.

Partenaires : agriculteurs, experts, Cirad

3.1.1. Référencement des arbres sur la parcelle d'étude de Cacao (surface 6 hectares)

Dans un premier temps nous avons référencé sur la parcelle l'ensemble des individus présents en distinguant les individus sur la parcelle de gauche et la parcelle de droite.

Sur chaque individu nous avons utilisé le référencement utilisant 3 lettres suivi de deux chiffres : A : *Aquilaria* ; C : Cacao ; D (droite) ou G (gauche) : correspond à la position de l'arbre sur le côté gauche ou droit de la parcelle. ; N° position de l'arbre sur la ligne ; N° position de l'arbre dans la ligne .

La parcelle présente des individus âgés de 1 an, 4 ans, 10 ans. Nous nous sommes intéressés aux individus âgés de 4 ans.

3.1.2. Identification des espèces d'*Aquilaria* du dispositif expérimental

a) Identification morphologique et anatomique

N'ayant aucune connaissance sur l'identité botanique des individus, nous avons réalisé des herbiers sur les individus en phase de fructification. Cela a permis d'identifier *Aquilaria rugosa* .



Réalisation des herbiers sur les arbres d'*Aquilaria* en phase de floraison et en phase de fructification

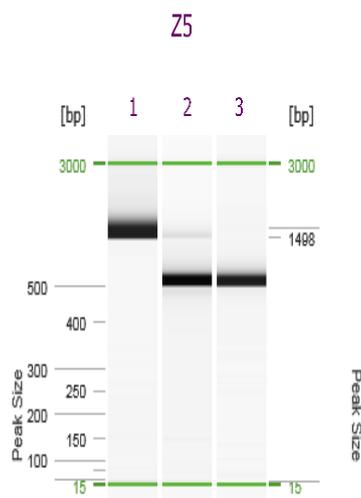
b) Mise au point d'une technique d'identification moléculaire : extraction d'ADN, amplification et séquençage.

À ce stade, la mise au point de la technique d'identification moléculaire est aboutie.

Cette mise au point a consisté en une extraction d'ADN à partir de 80 feuilles de divers individus d'*Aquilaria* du dispositif expérimental à Régina et à Cacao.

L'ADN total a été extrait en utilisant le protocole spécifique décrit dans le "Kit NucleoMag Plant" (Macherey nagel). L'amplification d'ADN a été effectuée par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant des amorces spécifiques trnL-TRNF, en combinaison avec des amorces spécifiques ITS2, et des amorces matK, suivant le protocole de Lee et al., 2016 (Taberlet et al., 1991 ; Chen et al., 2010). La concentration en ADN a été obtenue par spectroscopie en utilisant 1 µL d'extrait d'ADN dans le spectrophotomètre SimpliNano à micro-volume (Ge HealthCare®). Les produits d'ADN amplifiés ont été directement séquencés par la méthode Sanger. Ensuite, les séquences génétiques ont été alignées par une méthode bioinformatique utilisant le logiciel Geneious® pour créer une séquence consensus. Enfin, les séquences consensus ont été comparées à la base de données Genbank® (Kerse et al., 2012; Clark et al., 2016). Les 100 premiers résultats avec un pourcentage d'identité supérieur à 98% ont été pris en compte. L'assignation a été attribuée au meilleur score d'identité et de couverture de cette liste.

Dans cette étude, nous avons obtenu l'espèce *Aquilaria Crassna* pour les 80 échantillons analysés.



Réalisation des identifications moléculaires des Aquilaria dans les parcelles de Régina et de Cacao : Images des électrophorèses capillaires obtenues après amplification de l'ADN de 2 échantillons pour trois marqueurs génétiques. ; Les pistes 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux marqueurs matK, trnL-trnF et ITS2.

Production scientifique liée à cette partie du rapport

Publication en voie de soumission dans une revue à comité de lecture international

Genetic diversity of trees in the genus Aquilaria in French Guiana: phylogenetic characterization of the Aquilaria species by sequencing based on nucleic extracts from Aquilaria leaves.

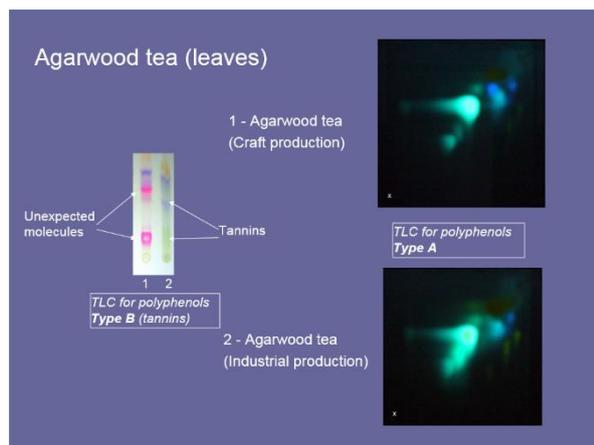
Alba Zaremski, Sovanmoly Hul, Chittana Phompila, Phtelasy Souladeth., Maurane Dolly, Thierry Leroy, Alexandre Vaillant, Marc Ducouso, Philippe Cao Van, Sithong Thongmanyong.,

Dolly M (2019) Mémoire : 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. Master 1- Interactions microorganismes hôtes environnement (IMHE), Université de Montpellier II, Montpellier. 40 p.

3.1.3. Récolte de feuilles fraîches, sèches, matures et juvéniles pour leur étude phytochimique.

Développement de méthodes pour déterminer la signature chimique des feuilles d'*Aquilaria* à partir de la chromatographie sur couche mince.

Cette technique simple permet de séparer les molécules à partir d'un mélange complexe (extrait). Les conditions permettant de séparer les composés majoritaires dont la mangiférine sur des feuilles fraîches, sèches, matures et juvéniles ont été identifiées.



*Identification à partir des feuilles de la mangiférine, marqueur du genre Aquilaria.
 Cette méthode très simple d'utilisation servira à différencier le genre Aquilaria du genre Gyrinops, genre très
 proche d'Aquilaria : outil nécessaire pour la traçabilité des feuilles*

Production scientifique liée à cette partie du rapport

Publication

Andary C., Longepierre D., Lê Công Kiêt, Hul S., Zaremski A., Michaloud G.. 2019. Study of a chemotaxonomic marker able to identify the genus Aquilaria (Thymelaeaceae). Bois et Forêts des Tropiques, 341 : p. 29-38.

3.1.4. Etude de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles (analyse en chromatographie en phase gazeuse, GC/MS) en fonction des espèces, du terroir (Régina) et (Cacao) et du mode de contamination de l'arbre

Cette étude a pour objectif de proposer des méthodes permettant l'acquisition des signatures chimiques des feuilles en vue de proposer des méthodologies adaptées pour le contrôle de la traçabilité chimique des feuilles dans un but de standardiser les productions issues d'une filière de valorisation des feuilles dans le secteur de la tisanderie ou autre.

Nous avons appliqué la SPIR directement sur les poudres de feuilles et la CCM 2D, RMN du proton, HPLC sur les extraits issus des feuilles riches en polyphénols. L'échantillonnage se caractérise par le choix de 3 morphotypes de feuilles différents et de deux traitements agronomiques différents au niveau de la préparation de la parcelle avant la mise en culture : la parcelle de gauche a été sujette à une défriche mécanisée (bulldozer) comparativement à la parcelle de droite qui a été sujette à une approche type abattis/brulis. L'approche mécanisée conduit à la destruction de la couverture fertile du sol, un tassement du sol qui à terme influence le développement de l'arbre dont sa croissance.

Nous montrons qu'avec l'utilisation de la SPIR qui est un outil très intégrateur des caractéristiques physico-chimiques d'un échantillon, que notre échantillonnage s'organise en deux groupes qui sont fonction de la préparation du sol. L'utilisation de la RMN dans une approche métabolomique, qui consiste à prendre en compte les déplacements chimiques caractéristiques de l'ensemble des molécules présentes dans les extraits confirme l'existence de deux groupes liés à la position des arbres sur la parcelle. Cette observation peut résulter

d'une différence de composition qualitative ou quantitative en métabolites secondaires. Cependant les méthodes utilisées ne permettent pas d'identifier spécifiquement les molécules caractéristiques à l'origine de ces différences.

L'utilisation de procédés analytiques de type CCM, ou HPLC sont des approches permettant de séparer les molécules ou groupes de molécules de mélanges complexes. Les chromatogrammes CCM nous permettent de comparer les profils chimiques des différentes feuilles et nous observons la présence de composés marqueurs de l'Aquilaria tel que la mangiférine. Cette méthode développée permet d'une part de certifier que l'extrait est bien issu de feuilles d'Aquilaria. Une étude des différents spots détectés permet de mettre en avant deux types profils types qui se distinguent par la concentration de certaines molécules marqueurs :

- **Profil 1:** les CCM se caractérisent par une baisse très nette de la concentration des molécules **5** et **6**,
- **Profil 2:** le CCM se caractérisent par une hausse très nette de la concentration des molécules **1** et **8**,

A ce stade nous ne sommes pas en mesure d'identifier les spots 1, 5, 6, 8 car ils ne correspondaient à aucun standard de la liste des molécules susceptibles d'être présentes chez l'Aquilaria. Cela peut s'expliquer par le fait que les molécules soient présentes sous forme de glycosides.

L'analyse HPLC confirme la présence de la molécule marqueur la mangiférine et permet de confirmer la présence d'autres molécules telles que la genkwanine par exemple. Ces deux méthodes permettent d'avoir accès à la signature chimique des extraits de feuilles d'Aquilaria. Ce sont des méthodes relativement simples à mettre en œuvre, qui peuvent être conduites en routine pour valider la nature des extraits et leur appartenance au genre Aquilaria. Nous avons étudié les activités biologiques des extraits et l'analyse des teneurs en phénols totaux révèle que les teneurs observés sur notre échantillonnage sont en cohérence avec celles de la littérature concernant des Aquilaria issus d'Asie : avec un rendement extraits totaux (méthanol/eau 80 :20) de ; teneurs en phénols totaux de 144,89 93 µg EAG/mg ES ; activité antioxydante considérée comme forte à modérée.

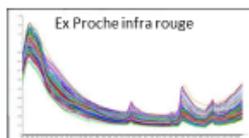
Nous pouvons conclure que les Aquilaria issus de Guyane présentent des activités en cohérence avec celles observées en Asie.



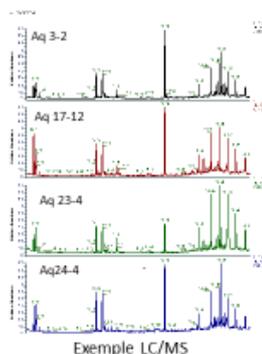
Feuilles *Aquilaria* sp.

Quel outil de certification sur la base des marqueurs chimiques pour assurer le suivi qualité pour secteur de tisannerie ?

✓ Approche globale : signature chimique



✓ Approche ciblée : recherche de marqueurs chimiques



Le bois Aquilaria, propriétés olfactives - Secteur cosmétique parfumerie

✓ Potentiel de production d'oléorésine par le bois blanc et feuilles ?

Rendement oléorésine bois blanc : 0,07 %

Rendement oléorésine les feuilles : 0,05 %

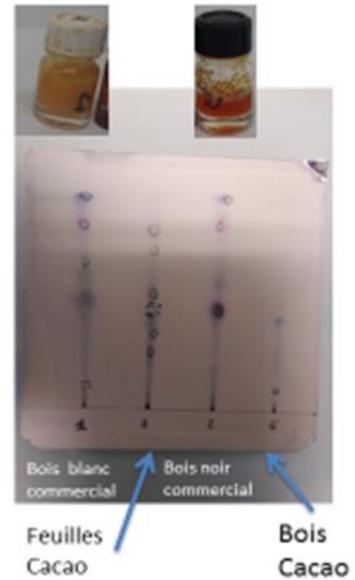
Analyse de la composition chimique en cours

✓ Quelles conditions pour la production de agar wood



Zone stressées

Suivi à 6 mois, 12, 24, 36, 5 ans → rendement et qualité oléorésine.



Production scientifique liée à cette partie du rapport :

Rapports

-Amusant N (2020) Rapport : Valorisation des feuilles dans le secteur de la tisanderie : quelles approches méthodologiques pour appréhender la signature chimique des feuilles ? 68 p.

-Chou Ket Kime Stéphanie (2015) Mémoire : Valorisation de Aquilaria Spp. en Guyane : Recherche d'oléorésine et étude phytochimique de la tisane. Licence 3 STS BB, Université de Guyane.

Colloques Internationaux

-Amusant N (2019) Conférence invitée- : Different approaches for the valorization of extractives of French Guyana wood species. Novembre 2019, Woodchem, Nancy.

-Houël E, Stien D, Amusant N (2019) Chemical defense of trees and wood natural durability: from protection to valorization. Québec: International Research Group on Wood Protection, 18 p. IRG 50/ 19-10946. International Research Group on Wood Protection. 50, Québec, Canada, 12 Mai 2019/16 Mai 2019.

3.2. Pour une production contrôlée d'agarwood d'*Aquilaria crassna* : approches métagénomique, biochimique et histologique

Partenaire : Cirad, experts

L'objectif du projet Aquil@Guyane est d'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, respectueuse de la biologie de l'arbre et de l'environnement.

Dans ce contexte cette étude a été orientée en vue de promouvoir la production de connaissances académiques de nature à contribuer au développement de la production d'agarwood d'*Aquilaria crassna* 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 basidiomycètes de Guyane de ces arbres. Puis nous avons testé la capacité de cellules de calcs d'*Aquilaria crassna* à produire de l'agarwood après inoculation de champignon, en laboratoire.

Pour la question de la production d'huile essentielle de qualité contrôlée ont été caractérisées les communautés fongiques qui vivent en interaction avec les arbres d'*Aquilaria* plantés en Guyane. Le but était d'identifier des champignons couramment retrouvés dans l'agarwood mais aussi des champignons propres aux champs de Guyane qui pourrait induire une composition singulière de l'agarwood des champs de Guyane.

Ces essais ont révélé 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 qui a été vérifié avec les agarwood témoins. Deux méthodes d'induction de l'agarwood ont été comparées : une méthode d'induction par blessure avec ou sans ajout de terre et une méthode d'induction par inoculation de champignon. Dans cette démarche de production biologique et localisée en Guyane, il a été décidé d'inoculer les *Aquilaria crassna* des plantations de Guyane avec des champignons Basidiomycètes lignivores dont les souches sont originaires de Guyane, en souche pure, sur éprouvettes de bois pour n'ajouter aucun adjuvant chimique.

Pour étayer ces résultats, la Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) a été utilisée pour la différenciation des différentes catégories de bois allant du bois blanc à l'agarwood.

Fort des résultats obtenus en champs, une méthode de culture de calcs d'*Aquilaria* a été mise au point. Les calcs ont ensuite été inoculés avec certaines des souches de champignons utilisées en champs, pour comparaison au laboratoire.

Résultats globaux

Sur les champs d'*Aquilaria crassna* en Guyane, les souches de champignons en interaction avec les *Aquilaria 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.

En effet, dans le village de Cacao, deux genres de champignons principaux sont en interaction 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. Il est donc le genre majoritaire de Régina.

A Cacao, les arbres blessés sont en interactions avec deux souches principales pour les parcelles A et B (les parcelles sont présentées en page 11), 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 détermination des souches de champignons présents dans les *Aquilaria* sain, 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.

C'est d'après ce résultat qu'il a été décidé d'inoculer, en souche pure, des champignons Basidiomycètes lignivores de Guyane dans des arbres d'*Aquilaria crassna* de Guyane. Ces champignons ont été sélectionnés pour leur origine Guyanaise, pour leur caractère lignivore, pour la relative facilité à les cultiver en souche pure au laboratoire ; ont été utilisés des champignons de pourriture fibreuse et des champignons de pourriture cubique pour pouvoir comparer leur efficacité respective. Ce mode d'inoculation a également été comparé avec l'inoculation par blessure avec ou sans ajout de terre.

Ces divers modes d'inoculation ont amené à la production d'agarwood par les *Aquilaria crassna* de Guyane. La méthode d'induction de l'agarwood par inoculation de champignons lignivores de Guyane en souche pure, notamment les champignons de pourriture fibreuse *Ganoderma resinaceum*, *Gloeophyllum trabeum* et *Pycnoporus sanguineus* est la plus performante pour obtenir un agarwood de qualité contrôlée proche de l'étalon interne.

L'utilisation de la Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) a été utilisée pour différencier les bois d'*Aquilaria crassna* de Guyane, en allant du bois blanc à l'agarwood, tout en contrôlant la qualité., et pour distinguer différentes compositions chimiques d'agarwood. Les résultats obtenus, qui concordent avec ceux de l'analyse biochimique, montre que l'utilisation de la SPIR pour contrôler les huiles essentielles d'agarwood en amont de l'hydrodistillation est parfaitement envisageable.

Cette méthode d'induction qui a réussi 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. Ces souches ont été sélectionnées pour leur caractère de pourriture fibreuse pour *Pycnoporus sanguineus*, de pourriture fibreuse en milieu tropical pour *Gloeophyllum trabeum* et ont été comparés à une souche de pourriture cubique d'*Antrodia 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 en vue de développer de l'agarwood en laboratoire, à partir de cals d'*Aquilaria*, et d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de défenses 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 dont on induit la production d'agarwood par diverses méthodes. Les recherches pourraient se prolonger en étudiant la production d'agarwood à partir des champignons identifiés les plus performants durant la phase 2 par la sélection de nouvelles souches guyanaises pour la production de l'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.

Pour développer le modèle en Guyane 6 phases ont été nécessaires les phases successives présentées ci-dessous :

- Phase1- Caractérisation des communautés fongiques présentes dans les arbres d'*Aquilaria* ;
- Phase 2- Caractérisation moléculaire de champignons lignivores de Guyane ;
- Phase 3- Evaluation de deux méthodes d'induction pour la production d'agarwood:
 - 1- une méthode d'induction par blessure avec ou sans ajout de terre de la plantation ;
 - 2- une méthode d'induction par inoculation de souches pures de champignon de Guyane.

Phase 4- Evaluation de la composition chimique des huiles essentielles obtenues après les deux méthodes d'induction pour la production d'agarwood.

Phase 5- Capacité des cellules de cals d'*A. crassna* à produire de l'agarwood après inoculation de champignon, en laboratoire.

Phase 6- Utilisation de la spectrométrie proche infrarouge (SPIR) pour différencier les « qualités » des agarwoods.

3.2.1. Phase1- *Caractérisation des communautés fongiques présentes dans les arbres d'Aquilaria. Quelles sont les communautés fongiques associées aux Aquilaria crassna de Guyane ?*

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.

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.

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 phylla 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 3.2.3. « 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

Méthodologie globale

Un échantillonnage à Cacao et à Régina a été réalisé sur 80 arbres d'*Aquilaria* : 20 arbres par parcelles : 10 sains et 10 inoculés/blessés 6 mois auparavant

Le prélèvement de la sciure de bois sain ou inoculé a été réalisé aseptiquement. Cette sciure a été conservée en azote liquide en champ puis au congélateur à -20°C au laboratoire.

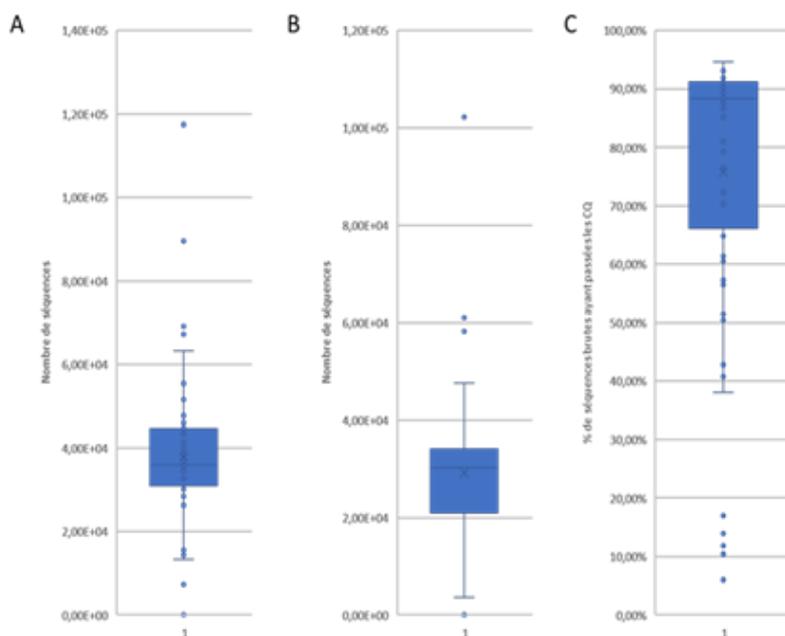
Des études moléculaires basées sur les analyses Métagénomiques ont été réalisées après extraction d'acides nucléiques; séquençage NGS Illumina et analyses bio-informatiques.



échantillonnage réalisé sur 80 arbres d'Aquilaria

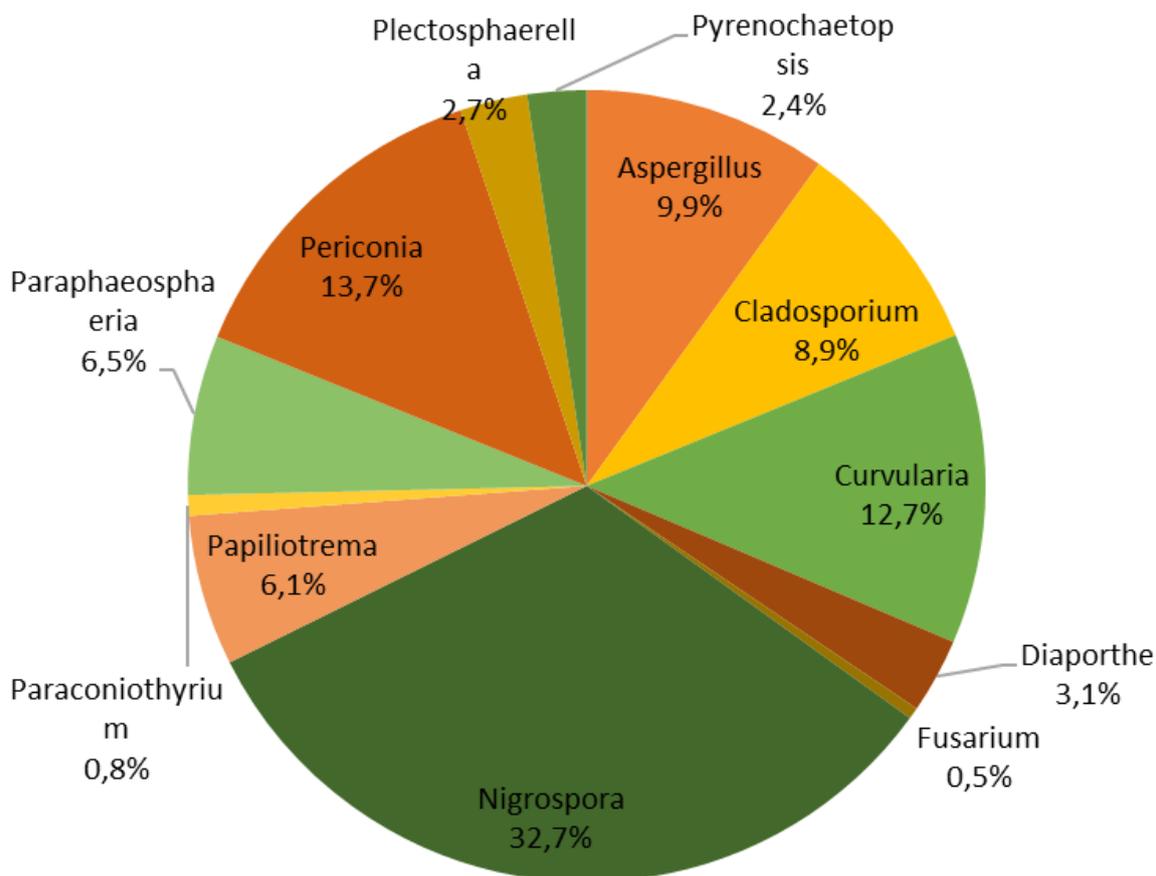
Résultats

Le séquençage de 56 échantillons de bois et de 3 de sols a permis de générer, en moyenne, 37.890 séquences par échantillon. Après traitement informatique, en moyenne 76 % des séquences ont été conservées. Ce qui indique que le séquençage est de bonne qualité.



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

La répartition des principaux genres de champignons obtenus dans les échantillons de bois (sain et blessés) des quatre parcelles de Guyane, est présentée ci-dessous. 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 %).



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

Production scientifique liée à cette partie du rapport :

Thèse de doctorat à l'école doctorale de l'Université de Guyane :

Zaremski C (2020) Pour une production contrôlée d'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte en Guyane : Approches métagénomique, biochimique et histologique. Université de Guyane. Thèse de doctorat. 207p.

Publications :

Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Zaremski A (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>

Publication en voie de soumission dans une revue à comité de lecture international:

-Review: a review of the conditions of worldwide agarwood production and development prospects in french guiana Why develop agarwood production in French Guiana?- Clara Zaremski, Claude Andary, Nadine Amusan³, Georges Michaloud, Marc Ducouso

-Characterization of the fungal communities associated with *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte plantations in French Guiana- Clara Zaremski, Cédric Malandain, Olivier Sibourg, Benjamin Heucli¹, Nadine Amusant, Marc Ducouso

Colloques nationaux et internationaux

- Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Zaremski A (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, Zaremski A (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, Ducouso 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.*

- Zaremski A (2016) Conférence invitée : NGS identification of fungi potentially implicated in the infection of *Aquilaria*, 23 and 24 November 2016, 5ième Edition Internationale de la Cosmetopée, Punaauia Catering and Hospitality College, Tahiti.

3.2.2. Phase 2-Caractérisation moléculaire de champignons lignivores de Guyane

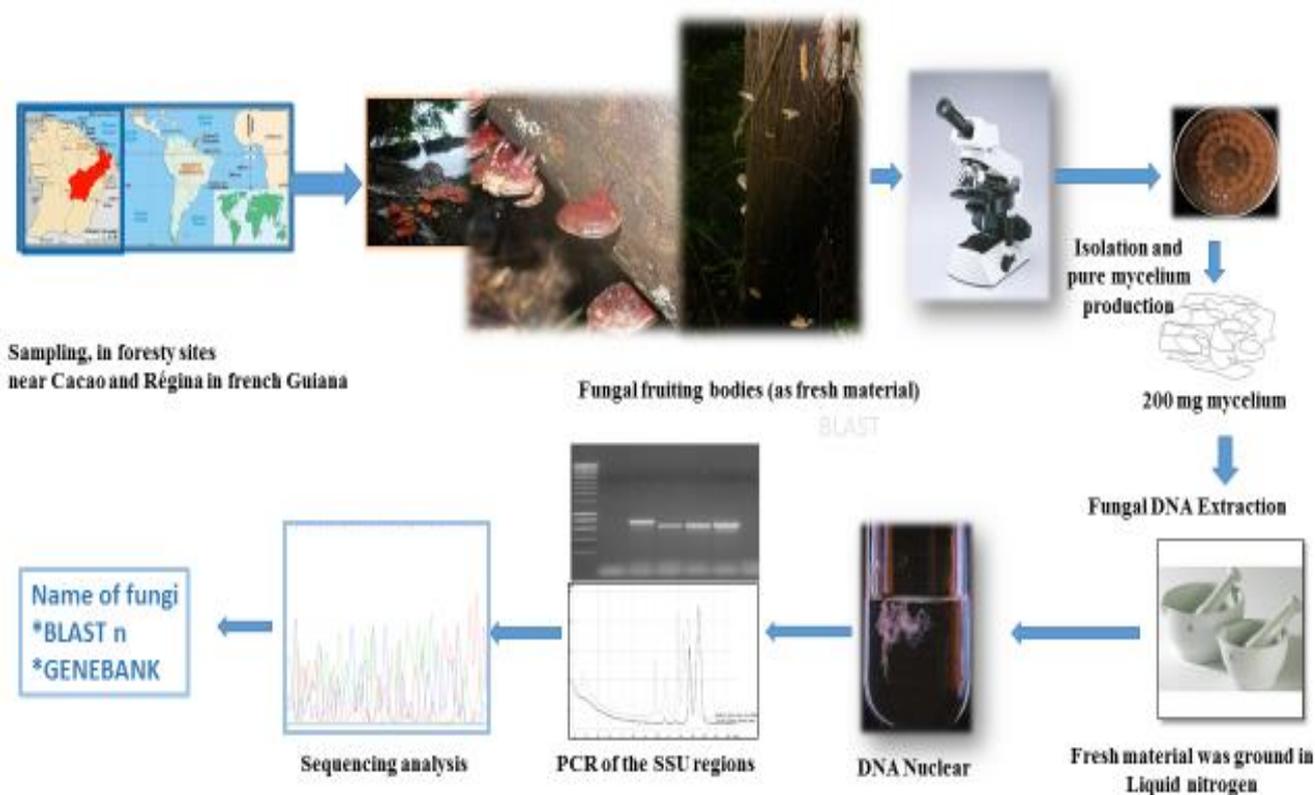
Identification et choix des champignons de Guyane pour l'étude

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. 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). Parmi les 39 échantillons les analyses par BlastN ont permis de mettre en évidence des proximités taxonomiques avec les genres *Antrodia*, *Coriolorpsis*, *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). Ces champignons ont été choisis du fait de leur fréquence élevée dans l'aire naturelle et donc aisément disponibles ainsi que de leur forte capacité à produire du mycélium en conditions en laboratoire. Toutes les souches sont des souches Guyanaïses. Les résultats de l'étude relative à la caractérisation moléculaire de champignons lignivores de Guyane ont mis en évidence des proximités taxonomiques avec les genres *Antrodia*, *Coriolorpsis*, *Fomitopsis* et *Rigidoporus*. *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Poria*, *Lentinus*, *Pycnoporus*, *Auricularia*, *Gloeophyllum*, *Trametes*.

Experimental Methods



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

Production scientifique liée à cette partie du rapport

Publication

Zaremski C, Ducouso-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

Rapport

- Ducouso-Détrez Amandine (2017) Mémoire : Étude de la diversité fongique présente dans des écosystèmes forestiers contrastés de Guyane. Montpellier : Université de Montpellier, Master 2 : Interactions microorganismes hôtes et environnements. *Biologie agrosociétés*. 61 p.

Colloque

-Ducouso-Détrez A (2018) Étude de la diversité fongique présente dans des écosystèmes forestiers contrastés de Guyane. *Les Agapiades*, Cirad, Montpellier.

-Zaremski C, Ducouso-Détrez A, Amusant N, Zaremski A (2019) Biodiversity of wood-decaying fungi in French Guiana sequences of the small subunit (SSU) of ribosomal (r) DNA and the two primer pairs 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/>

Suite à cette étude, 2 méthodes d'induction de l'agarwood ont été comparées

3.2.3. Phase 3- Evaluation de deux méthodes d'induction pour la production d'agarwood:

3.2.3.1. Première Méthode d'induction testée en Guyane : 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 envisageons une accélération du processus. Pour pouvoir comparer ces types de blessures, nous avons sélectionné des arbres à trois tiges minima 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 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 (Cf. photo ci-dessous). 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).



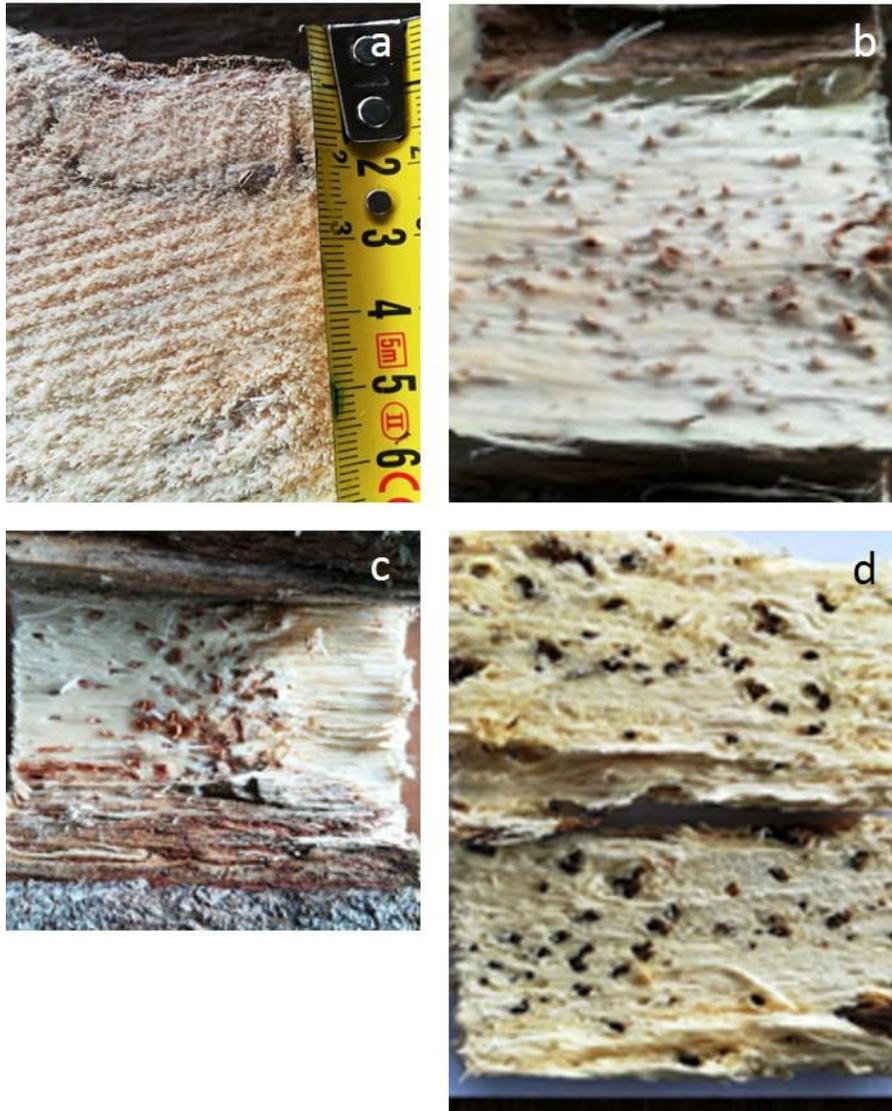
Pour inoculer les Aquilaria avec les champignons environnementaux, les arbres sont sélectionnés avec des troncs ayant minimum 3 fourches.

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 placé sur la blessure pour maintenir la terre et favoriser la contamination.

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. Une réaction d'exsudation figure après 6 mois et 12 mois dans les branches d'Aquilaria stressées avec de la terre et sans terre. A 2 cm de profondeur en dessous de l'écorce, on distingue une limite foncée qui représente la limite de l'effet du stress. On remarque la présence d'exsudats solidifiés plus ou moins colorés et la présence d'une fibre foncée, au milieu (Cf. photo ci-dessous).



*Résultats : induction par blessure avec ou sans ajout de terre de la plantation
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.

3.2.3.2. Deuxième méthode d'inductin testée en Guyane : Induction par inoculation de 7 souches pures de champignons de Guyane.

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. En effet, des études précédentes avaient montré que plus la durée entre la blessure et la récolte d'échantillons et plus il y avait de chance d'avoir une formation d'agarwood, 9 mois semblant être la durée expérimentale minimale.

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. (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. (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. (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 (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" (g). L'expérience est faite sur 3 arbres par "champignon" et aussi 3 arbres pour les éprouvettes témoins.



Protocole d'inoculation par insertion des éprouvettes de bois (a à f), observations et découpe des arbres

Résultats obtenus après Induction par inoculation de 7 souches pures de champignon de Guyane.

Après 9 mois d'inoculation, nous découpons des troncs pour les observations, puis nous découpe des rondelles autour des « fenêtres » selon les pointillés rouges et au milieu de la « fenêtre » selon les pointillés orange.



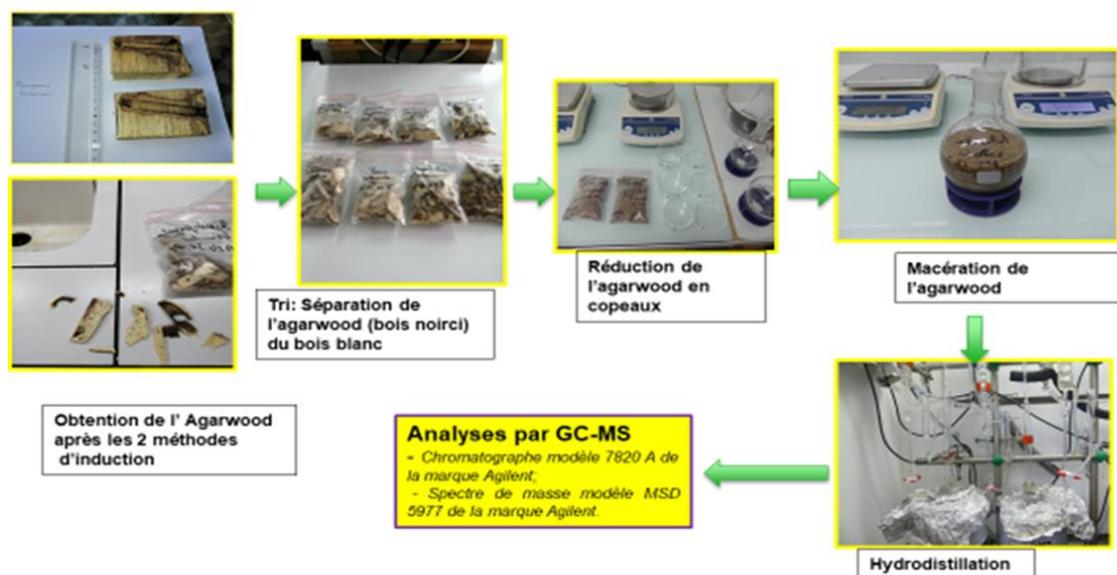
Photographies de chacune des conditions d'inoculation et des témoins après découpe selon la Figure 1.h & i.

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).

3.2.4. Phase 4- Évaluation de la composition chimique des huiles essentielles obtenues après les deux méthodes d'induction pour la production d'agarwood.

Méthodologie globale :

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 copeaux, par arbre, ont été hydrodistillés dans 350 mL d'eau milli-Q et nous avons rajouté dans le clewenger un standard interne, le tridécano. 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 préliminaires 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 dit de référence (non contaminé). Au terme de ce premiers essai nous avons lancé l'ensemble des analyses avec les conditions suivantes : 5mL de tridécano (0,04 mg/mL) et durée d'hydrodistillation 8h).



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, caractérisés plutôt par la présence de composés aromatiques ou dérivés et d'autres molécules non caractéristiques de l'agarwood.

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

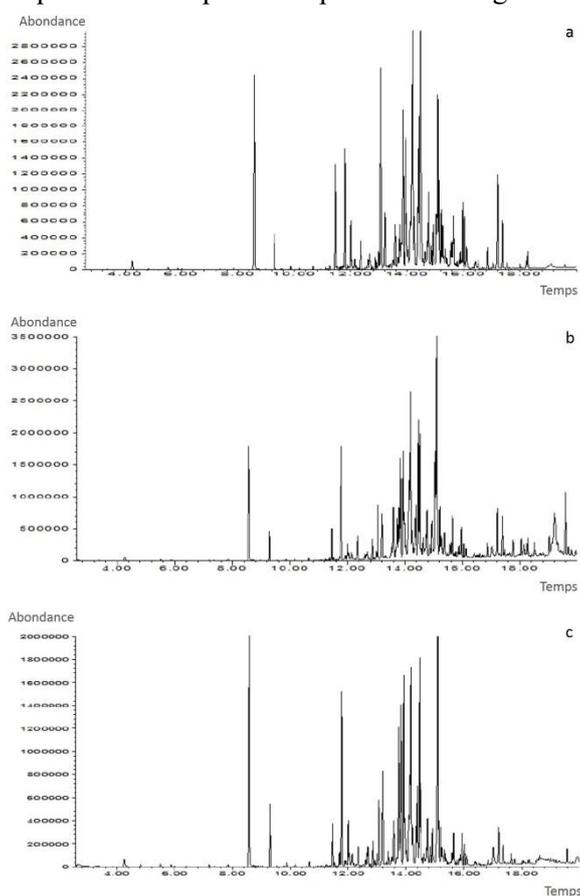
Ainsi, l'agarwood obtenu par inoculation de souches de champignons sélectionnées, sur éprouvettes de bois a un assemblage de composés volatils plus proche de celui de l'agarwood commercial que l'agarwood obtenu par l'inoculation de champignons environnementaux et même que l'agarwood du Laos. Cela est 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 hydrodistillations de l'agarwood des arbres inoculés par les champignons de pourriture fibreuse, sont intéressants : de 0,074 % à 0,178 %. Les rendements après hydrodistillation de l'agarwood 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 %. Ces chiffres sont proches des rendements obtenus en milieu naturel. Les rendements les plus élevés sont obtenus à partir des agarwoods inoculés par *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* et *Ganoderma resinaceum*.

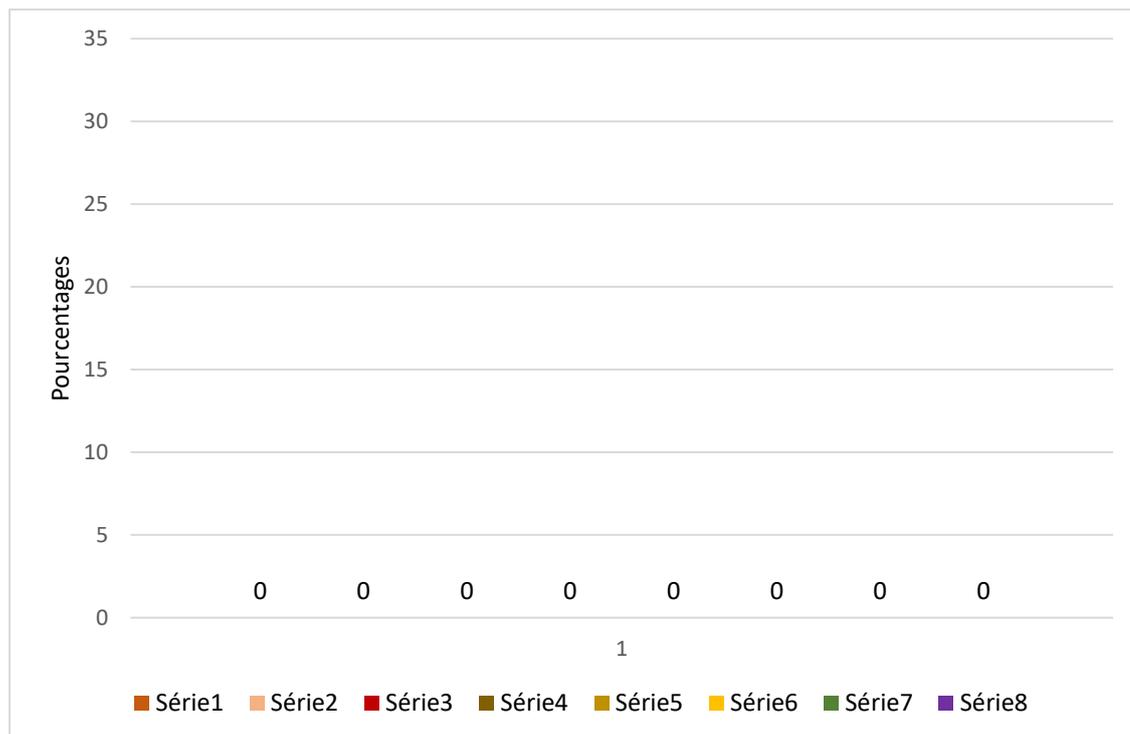
Suite à cette étude, a été calculée une estimation du rendement des plantations Aquilaria en Guyane après hydrodistillation. Pour un hectare de plantation, nous pourrions obtenir annuellement pour des arbres sans agarwood : 0,6 litres d'huile essentielle de bois blanc ; pour des arbres avec agarwood : 1,2 litres d'huile essentielle d'agarwood et 0,48 litres d'huile essentielle de bois blanc.

Comme attendu les rendements après hydrodistillations d'agarwood des arbres inoculés par les champignons environnementaux sont beaucoup plus faibles, allant de 0,00024 % à 0,02 %.

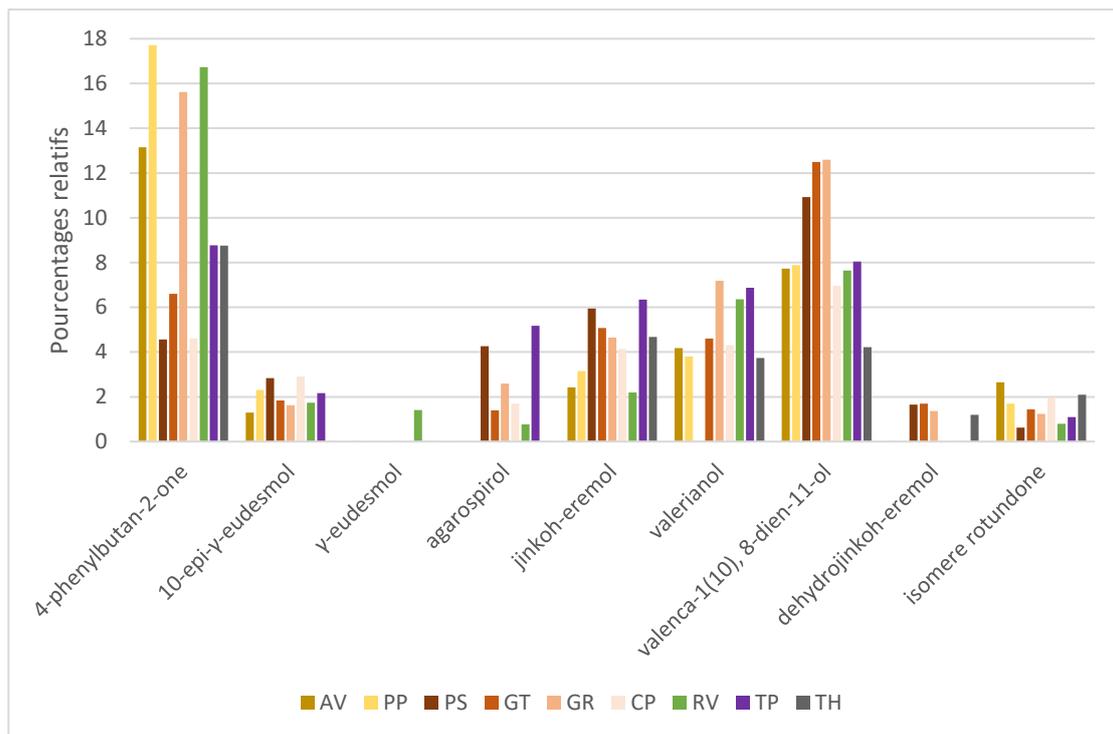
En vue des résultats, on peut donc conclure que le mode d'induction du stress et d'inoculation des souches de champignons en inoculation en souche pure sur éprouvettes de bois est la plus adaptée. Cette méthode est novatrice car l'inoculation des champignons est faite en souche pure. D'un point de vue 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.



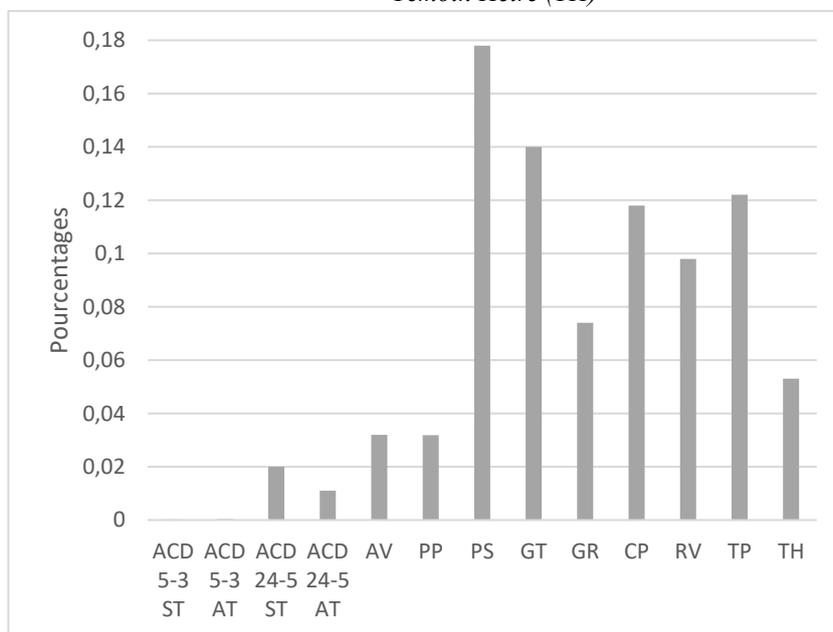
Chromatogrammes des échantillons extraits de certains arbres inoculés avec les champignons lignicoles de Guyane, dont les profils sont les plus proches de l'agarwood industriel *Gloeophyllum trabeum* (GT) (a), *Coriopsis polyzona* (CP) (b) ; le Témoin (TP) (c).



Proportions des différentes familles de structures moléculaires du bois noir 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) et un témoin négatif : Témoin Pin (TP).



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)



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).

3.2.5. Phase 5- Capacité des cellules de cals d'*A. crassna* à produire de l'agarwood après inoculation de champignon, en laboratoire :

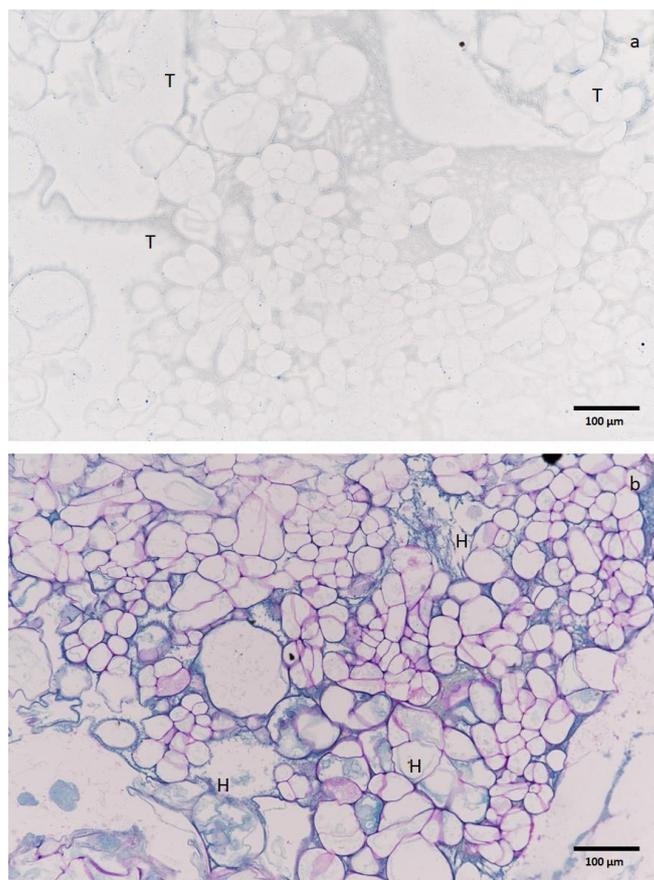
L'objectif de cette étude est de mettre en place des méthodes d'études en laboratoire pour comprendre les mécanismes cellulaires de la production d'agarwood par *Aquilaria*. Ainsi, après avoir élaboré un protocole de production de cals d'*A. crassna*, une étude histologique à partir de la coloration 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 développée pour mettre en évidence la production d'huiles essentielles dans les cals colonisés par les souches de champignons sélectionnés.

L'approche histologique à partir de technique 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 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 la cal contaminé avec la souche de *Pycoporus sanguineus*.

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 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.



*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 (a) jusqu'à recouvrir la totalité des explants (b).*



Observation au microscope optique d'une coupe de cals d'Aquilaria crassna inoculé 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) de 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).

Production scientifique liée à cette partie du rapport

Publication en voie de soumission dans une revue à comité de lecture international

Histological study of Aquilaria crassna calli colonized by the wood-decay fungi Pycnoporus sanguineus, Gloeophyllum trabeum and Antrodia vaillantii.

Clara Zaremski, Nadine Amusant, Claude Andary, Christine Sanier, Maurane Dolly, Pascal Ilbert, Axel Labeyrie, Fabienne Morcillo, Alba Zaremski, Marc Ducouso.

Rapport

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

3.2.6. Phase 6 : Développement à venir : Utilisation de la spectrométrie proche infrarouge (SPIR) pour différencier les « qualités » des agarwoods,

L'agarwood est issu d'une réaction de l'arbre à un stress, généralement une blessure puis 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

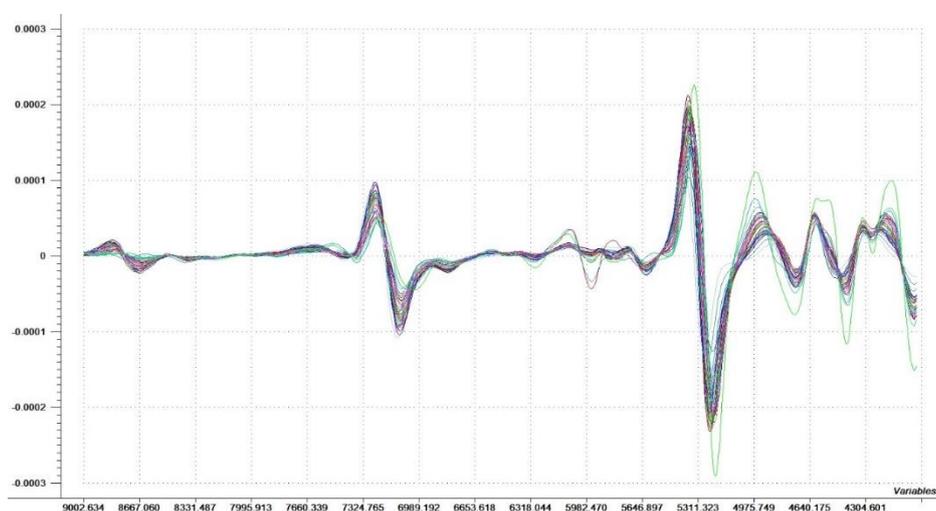
diffèrent largement d'une région à l'autre, d'un mode d'induction de la production de l'agarwood à l'autre ; en résulte une large diversité de qualité d'agarwood.

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 à un témoin d'agarwood du Laos de référence 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 de 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.



*Présentation de la collection spectrale.
Abscisses : nombre d'ond*

es, Ordonnées : absorbance (log I/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.

[Production scientifique liée à cette partie du rapport](#)

Publication en voie de soumission dans une revue à comité de lecture international

Rapid detection of agarwood and assessment of its chemical composition by near infrared spectroscopy (NIRS)

Clara Zaremski, Marc Ducouso, Gilles Chaix, Nadine Amusant

4. Les actions économiques

Étude de faisabilité économique et étude des facteurs permettant la mise en place d'une filière d'huiles essentielles d'*Aquilaria* en Guyane selon une échelle micro et macroéconomique.

Partenaire : GDI, Cirad

Cette étude est pilotée par Guyane Développement Innovation (GDI), qui a en charge le développement des filières innovantes.

L'étude a été confiée au prestataire Ecozept, bureau d'études spécialisé dans le domaine de l'agroalimentaire durable, qui a développé les volets suivants : enquête de terrain ; coûts de production et chaîne de valeur ; établissement d'un modèle économique permettant de construire des scénarios et d'établir une grille d'aide à la décision en fonction des paramètres micro et macroéconomiques ; évaluation des effets d'échelles liés à la ressource, à l'agroforesterie et aux labellisations-certifications possibles.

Ecozept a exposé ses premiers résultats en Guyane le 18 janvier 2019 et sa restitution finale de l'étude économique le 22 octobre 2020, afin de rendre compte de l'adaptation de ses données au contexte guyanais (Cf. Rapports 2019 et 2020).

Les atouts, faiblesses, opportunités et menaces du projet ont été évalués. **Les atouts** sont forts et encourageants, notamment le fait qu'un groupe de producteurs s'est formé et pousse le projet dynamiquement, de façon autonome et sans hésiter à investir. Les opportunités sont prometteuses et réalistes. Dans **les faiblesses**, on retrouve le cas classique d'une filière en création, mais sans facteur bloquant. Les obstacles sont identifiés et les travaux pour les lever ou les réduire sont déjà en cours. Dans **les menaces**, figure le fait que « la concurrence ne dort pas ». En effet, d'autres régions du monde profitent du dynamisme autour de l'*Aquilaria*, avec des acquis importants (expériences en production, transformation et commercialisation). Mais l'atout lié à la « filière intra-européenne » peut contrer cette menace, sous condition d'une organisation efficace qui noue rapidement des liens avec l'aval industriel en Europe.

Organisation et concertation

Ecozept attire l'attention des parties prenantes sur le fait que le groupe d'arboriculteurs devrait, à terme, se constituer sous forme d'une entité juridique, notamment quand il s'agira d'engager des investissements collectifs (distillation), d'entrer dans une démarche de labellisation (certification collective) et de commercialisation (regroupement de l'offre).

La forme juridique à trouver doit respecter les exigences du projet : - souplesse et réactivité pour la mise en marché (idéalement une SARL) ; - solidarité et transparence entre producteurs (idéalement une coopérative) ; - ouverture et facilité d'accès pour un réseau large (association) ; - facilité d'intégrer des capitaux étrangers au groupe-cœur (SAS). La combinaison de ses formes est possible. Un processus de concertation, accompagné par un expert dans ce domaine, paraît pertinent.

Production agricole

La production agricole est à un stade bien avancé, avec une première plantation en maturité de récolte, au moins pour des analyses et essais. On peut d'ailleurs parler d'une potentielle originalité du système de production guyanais : pendant que, dans les autres régions productrices, on opte généralement pour des cultures très denses où l'on coupe ensuite les arbres entiers, il paraît possible en Guyane de procéder par élagage : sur la douzaine de branches que forment les arbres *Aquilaria*, on peut ainsi en prélever plusieurs, tout en laissant l'arbre continuer à pousser, ce qui donne plus de souplesse au système d'exploitation.

Conclusions sur le modèle économique

Le projet de produire de l'huile essentielle d'*Aquilaria* en Guyane pour le marché européen reste pertinent à la vue des estimations effectuées dans le rapport.

Une appréciation positive et encourageante

La production de l'huile essentielle d'*Aquilaria* en Guyane constitue une opportunité intéressante pour les agriculteurs. Le choix de l'hydrodistillation comme solution technologique pour l'extraction de l'huile essentielle paraît pertinent et correspond aux réalités à la fois rencontrées dans les autres régions de production et en Guyane.

Les investissements pour la distillation sont importants (entre 200.000 € et 400.000 €) mais selon les informations récoltées et les raisonnements exposés, on peut s'attendre à des bonnes perspectives de mise en marché ainsi qu'à une bonne rémunération de l'activité agricole/arboricole, et donc à un retour sur investissement correct et planifiable.

Recommandations pour les prochaines étapes

Les recommandations d'ECOZEPT pour ce projet sont les suivantes : Poursuivre le projet avec vigueur et célérité ; Regrouper la matière première ; Organiser la distillation/extraction ; Organiser l'intégralité de la filière en Guyane ; Prendre contact avec l'aval industriel, dès que les caractéristiques de l'offre sont connues.

Pour la suite du projet, ECOZEPT propose d'articuler les efforts autour du domaine de l'extraction en termes de recherches, formations, décision sur l'itinéraire technique, investissement. Dans le cadre du projet tel qu'il est défini aujourd'hui il faudra scénariser les modèles économiques, approfondir les scénarii retenus vers la contractualisation et la mise en relation avec l'aval industriel en Europe.

Pour la suite du projet, des recommandations peuvent être formulées :

- *Valider le choix du scénario et l'affiner* : En réunissant le groupe de producteurs et les financeurs potentiels, il convient de valider le choix du scénario « hydrodistillation » et de l'affiner. En approfondissant les contacts avec les constructeurs d'équipements on peut affiner les choix technologiques (dimensionnement, équipements en détail. Il paraît utile d'associer à ce stade une personne ressource expérimentée dans l'hydrodistillation d'*Aquilaria*. Il faut aussi décider d'un site d'implantation potentiel, du financement et le cas échéant d'un bâtiment qui abrite les installations nouvelles.

En même temps, il faut affiner les connaissances sur la production agricole et les produits. Pour la production agricole il s'agit de calibrer les rendements ainsi que les coûts et les efforts d'entretien, de traitement et de récolte. Pour les produits (l'huile essentielle), il faut établir une analyse « communicable » (fiche produit à communiquer aux acteurs de l'aval) sur les huiles essentielles issues du projet. Si le premier choix porte sur l'hydrodistillation, rien n'empêche de continuer les réflexions sur l'installation d'un site d'extraction en CO2 supercritique dans un cadre plus large et en considérant une synergie entre plusieurs filières. En effet, cette technologie peut apporter un avantage stratégique à terme.

- *Formaliser le groupe porteur*

La gouvernance du projet appelle une forme d'organisation, groupement, association, société ou autre, pour formaliser la prise de décision et les actions à mener. Le point ou moment de cristallisation est certainement l'investissement dans le site de distillation qu'il s'agit de gérer ensemble, ensuite il faut une structure qui organise la commercialisation. Il convient d'associer un juriste à ces réflexions.

- *Définir le positionnement commercial*

Une première définition du produit est déjà connue, elle est quasi implicite : l'huile essentielle d'*Aquilaria* est unique parce qu'elle est issue d'une filière transparente et (légalement) intra-européenne. Ce positionnement est attractif pour les acteurs économiques de l'aval en Europe et en Amérique du Nord, nous l'avons validé dans nos interviews d'experts pendant le projet.

Il s'agit de compléter ce positionnement unique, de le solidifier et compléter par des arguments auxquels l'aval est aujourd'hui sensible : - Garantie de la qualité du produit ; - Respect de la biodiversité et des milieux naturels ; - Engagement, documentation et contrôle qu'il s'agit des plantations mixtes, pluri-espèces ; - Plantations garanties sans impact sur la forêt vierge naturelle ; - Certification relations commerciales équitables et certification bio (les agriculteurs engagés sont déjà certifiés) ; - Neutralité carbone ou bilan carbone positif : engagement sur le CO2 fixé par les plantations, organisation d'une économie circulaire p. ex. transformations des copeaux en compost après extraction ou utilisation des copeaux en tant que combustible renouvelable. Ces points peuvent rentrer dans un cahier de charges pour la production agricole et pour la transformation.

- *Se rapprocher de l'aval et nouer des partenariats*

Une fois que le dimensionnement du projet (volumes annuellement produits, qualités) est connu, on peut se rapprocher de l'aval, notamment des parfumeurs en France, à la recherche de partenariats sous forme de contractualisation verticale. Ces partenariats peuvent inclure des garanties mutuelles, telles que la vente exclusive vers le partenaire en aval qui lui s'engage à l'achat au volume et au prix (ou fourchette de prix) garantis. Le partenaire en aval peut être invité à participer au financement des investissements, et obtenir un retour sur investissement sous forme de relations commerciales privilégiées.

Suite aux présentations d'ECOZEPT et des données économiques exposées, nous avons estimé le rendement des plantations *Aquilaria* en Guyane après hydrodistillation (Cf. ci-dessous) :

Rendement des plantations *Aquilaria* en Guyane après hydrodistillation.

Dans les plantations actuelles en Guyane, environ 200 arbres par hectare.

Afin de ne pas mettre en danger la santé des arbres, prélever 10 % de bois par an sur chaque arbre semble raisonnable. Il est également possible d'abattre les arbres tous les 10 ans et de les replanter. Le pourcentage annuel de prélèvement de 10 % est ainsi le même.

Un arbre *Aquilaria* produit environ 300 kg de bois.

En milieu naturel, sur les arbres avec agarwood, l'agarwood représente environ 10 % du bois produit.

En culture, sur les arbres avec agarwood, l'agarwood représente un maximum de 33 % du bois produit (Voir thèse Zaremski Clara page 55). Nous pouvons raisonnablement estimer qu'il se situera aux environs de 20 % suite à inoculation de champignons.

Pour 1 hectare par an il peut donc être produit :

- pour des arbres sans agarwood : $300 \text{ kg} \times 10 \% \times 200 \text{ arbres} = 6000 \text{ kg}$ de bois blanc par an.
- pour des arbres avec agarwood : $300 \text{ kg} \times 10 \% \times 200 \text{ arbres} \times 20 \% = 1200 \text{ kg}$ d'agarwood par an et 4800 kg de bois blanc.

Pour les rendements après distillation, la littérature avance un rendement de 0,1 % pour la distillation d'agarwood et 0,01 % pour la distillation du bois blanc.

Selon la thèse de Zaremski Clara, les rendements de distillation d'agarwood sont en moyenne de 0,1 % pour les *Aquilaria* des plantations actuelles (Voir thèse pages 124 et 125).

Le rendement de la distillation du bois blanc des *Aquilaria* de Guyane n'a pas été étudié ; comme il est habituellement le dixième du rendement d'agarwood, il serait de 0,01 %.

Pour un hectare de plantation, nous pourrions obtenir annuellement, pour l'huile essentielle après distillation :

- pour des arbres sans agarwood : $6000 \text{ kg} \times 0,01 \% = \mathbf{0,6 \text{ Kg}}$ d'huile essentielle de bois blanc.
- pour des arbres avec agarwood : $1200 \text{ kg} \times 0,1 \% = \mathbf{1,2 \text{ Kg}}$ d'huile essentielle d'agarwood et $4800 \text{ kg} \times 0,01 \% = \mathbf{0,48 \text{ Kg}}$ d'huile essentielle de bois blanc.

L'huile essentielle de bois blanc peut être vendue à 20 000 euros le litre, conditionnée petit flacon et vente directe au consommateur.

L'huile essentielle d'agarwood peut être vendue à 40 000 euros le litre, conditionnée petit flacon et vente directe au consommateur.

Prix à diviser par deux si le produit est vendu à des industriels.

En conclusion, chaque année pour un hectare de plantation et un conditionnement en petits flacons et vente directe, le **chiffre d'affaires** sera de :

- en cas d'exploitation d'arbres à bois blanc uniquement : $0,6 \text{ Kg} \times 20\,000 = \mathbf{12\,000 \text{ euros}}$.
- en cas d'exploitation d'arbres à agarwood : $1,2 \text{ Kg} \times 40\,000 = 48\,000 \text{ euros}$ (agawood) + $0,48 \text{ Kg} \times 20\,000 = 9\,600 \text{ euros}$ (bois blanc) soit un total de **57 600 euros**.

En cas de vente aux industriels, **chiffre d'affaires à diviser par deux**.

Le chiffre avancé par « Ecozept » de 20 à 30 Kg d'huile à produire par an correspond à la demande de chacun des grands parfumeurs (Voir diapositive n°6 de la présentation « Ecozept » du 22/10/2020). Il conviendra de multiplier ces quantités par le nombre de grands parfumeurs.

Production scientifique liée à cette partie du rapport :

-Roubaud F, Rinna K, Schaer Burkhard (2019) : Rapport économique, Intermédiaire : Étude de faisabilité économique et étude des facteurs permettant la mise en place d'une filière d'huiles essentielles d' Aquilaria en Guyane selon une échelle micro et macroéconomique. 30 pp.

-Roubaud F, Rinna K, Schaer Burkhard (2020) : Rapport économique, Final : Étude de faisabilité économique et étude des facteurs permettant la mise en place d'une filière d'huiles essentielles d' Aquilaria en Guyane selon une échelle micro et macroéconomique. 37 pp.

5. Promotion, valorisation, formation, communication, publicité du projet

Aquil@Guyane sur le territoire guyanais

Partenaire : GDI, Cirad, CTG, Agriculteurs

Quatre Articles dans des revues nationales et internationales

- Zaremski C. Pour une production contrôlée d'agarwood d'*Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte en Guyane : approches métagénomique, biochimique et histologique. Clara Zaremski - Publié le 20 juillet 2020 <https://doi.org/10.19182/bft2020.344.a31900>- Bois et Forêts des Tropiques – ISSN : L-0006-579X Volume 344 – 2e trimestre – juillet 2020 – p. 73-74.
- Andary C., Longepierre D., Lê Công Kiêt, Hul S., Zaremski A., Michaloud G.. 2019. Study of a chemotaxonomic marker able to identify the genus *Aquilaria* (Thymelaeaceae). Bois et Forêts des Tropiques, 341 : p. 29-38. <https://doi.org/10.19182/bft2019.341.a31744>.
- Zaremski C, Ducouso-Détrez A, Amusant N, Zaremski A (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, Zaremski A (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>

Six Articles en voie de soumission dans des revues nationales et internationales

- Review: a review of the conditions of worldwide agarwood production and development prospects in french guiana. Why develop agarwood production in French Guiana? Clara Zaremski, Claude Andary, Nadine Amusant, Georges Michaloud, Marc Ducouso
- Characterization of the fungal communities associated with *aquilaria crassna* pierre ex lecomte plantations in french guiana. Clara Zaremski, Cédric Malandain, Olivier Sibourg, Benjamin Heuclin, Nadine Amusant, Marc Ducouso
- Chemical Composition Of Agarwood From *Aquilaria Crassna* Pierre Ex. Lecomte Planted In French Guiana, Depending On The Induction Method. Clara Zaremski, Nadine Amusant, Marc Ducouso, Georges Michaloud, Benjamin Heuclin, Claude Andary, Chantal Menu
 - Rapid detection of agarwood and assessment of its chemical composition by near infrared spectroscopy (NIRS). Clara Zaremski, Marc Ducouso, Gilles Chaix, Nadine Amusant
- Histological study of *Aquilaria crassna* calli colonized by the wood-decay fungi *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* and *Antrodia vaillantii*. Clara Zaremski, Nadine Amusant, Claude Andary, Christine Sanier, Maurane Dolly, Pascal Ilbert, Axel Labeyrie, Fabienne Morcillo, Marc Ducouso
- Genetic diversity of trees in the genus *Aquilaria* in French Guiana: phylogenetic characterization of the *Aquilaria* species by sequencing based on nucleic extracts from *Aquilaria* leaves. Chittana Phompila, Sithong Thongmanivong, Phetlasy Souladeth, Philippe Cao Van, Marc Ducouso, Thierry Leroy, Alba Zaremski, Georges Michaloud, Claude Andary, Sovanmoly Hul.

Formations

- Thèse de doctorat à l'école doctorale de l'Université de Guyane

Pour une production contrôlée d'agarwood d'Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte en Guyane : Approches métagénomique, biochimique et histologique. Université de Guyane. Thèse de doctorat. 207p. - Zaremski C (2020).

- Clara Zaremski a présenté au jury et à l'auditoire sa thèse réalisée dans le cadre du projet Aquil@Guyane : « *Pour une production contrôlée d'agarwood d'aquilaria crassna en Guyane : approche métagénomique, biochimique et histologique* ». [https://www.ctguyane.fr/projet-aquilaria-guyane-clara-zaremski-a-presente-sa-these/?utm_source=feedburner&utm_medium=email&utm_campaign=Feed%3A+CTGuyane+\(Collectivit%C3%A9+Territoriale+de+Guyane\)](https://www.ctguyane.fr/projet-aquilaria-guyane-clara-zaremski-a-presente-sa-these/?utm_source=feedburner&utm_medium=email&utm_campaign=Feed%3A+CTGuyane+(Collectivit%C3%A9+Territoriale+de+Guyane)).

- Obtention de prix : En 2019, dans le cadre de sa thèse, la doctorante de l'école doctorale de Guyane a reçu une distinction pour la pertinence des travaux menés dans le cadre du projet Aquilaria. La distinction ou « Ron Crocroft Award » sera réalisée au Japon, en novembre 2021, dans le cadre d'une conférence internationale organisée par l'IRG (International Research Group on Wood Protection). *Chemical composition of agarwood of Aquilaria crassna Pierre ex. Lecomte induced by Basidiomycetes from French Guiana.* Zaremski C., Ducouso M., Andary C., Zaremski A (2020)

- 4 étudiants de niveau : BTS, licence 3, master 1 et master 2

-Dolly M (2019) Mémoire : *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.* Master 1- Interactions microorganismes hôtes environnement (IMHE), Université de Montpellier II, Montpellier. 40 p.

-Jahn-Oyac Arnaud (2018) Mémoire : *Inoculation de souches pures de champignons par éprouvettes de bois contaminées.* Laboratoire Substances naturelles amazoniennes- LSNA- UMR EcoFoG. 10 p.

-Ducouso-Détréz Amandine (2017) Mémoire : *Étude de la diversité fongique présente dans des écosystèmes forestiers contrastés de Guyane.* Montpellier : Université de Montpellier, Master 2 : Interactions microorganismes hôtes et environnements. Biologie agrosociétés. 61 p.

-Chou Ket Kime Stéphanie (2015) Mémoire : *Valorisation de Aquilaria Spp. en Guyane : Recherche d'oléorésine et étude phytochimique de la tisane.* Licence 3 STS BB, Université de Guyane.

Huit Communications orales avec articles dans les colloques nationaux et internationaux

- Houël E, Stien D, Amusant N (2019) *Chemical defense of trees and wood natural durability: from protection to valorization.* Québec : International Research Group on Wood Protection, 18 p. IRG 50/ 19-10946. International Research Group on Wood Protection. 50, Quebec, Canada, 12 Mai 2019/16 Mai 2019.

- Zaremski C, Ducouso-Détréz A, Amusant N, Zaremski A (2019) *Biodiversity of wood-decaying fungi in French Guiana sequences of the small subunit (SSU) of ribosomal (r) DNA and the two primer pairs 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 A, Rabaud S, Duportal M, Ducouso M, Amusant N, Zaremski C (2019) 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. https://aquilaria.cirad.fr/content/download/4252/31771/version/2/file/Aquilaria++HUILES+ESSEN-30-09-19_compressed.pdf.

- Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Zaremski A (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.
- Ducouso-Détréz A (2018) *Étude de la diversité fongique présente dans des écosystèmes forestiers contrastés de Guyane*. Les Agapiades, Cirad, Montpellier
- Zaremski C, Malandain C, Sibourg O, Zaremski A (2017) *NGS analysis of fungal OTUs in Aquilaria sp. from French Guyana, Cambodia, Laos and Thailand*. In: 48th IRG Annual Meeting Proceedings, Ghent, Belgium, 4-8 June 2017. IRG. s.5: s.n. 18 p. <http://agritrop.cirad.fr/585227>.
- Zaremski C, Amusant N, Ducouso 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.

Deux Conférences internationales invitées

- Amusant N (2019) Conférence invitée- : *Different approaches for the valorization of extractives of French Guyana wood species*. Novembre 2019, Woodchem, Nancy.
- Zaremski A (2016) Conférence invitée - *NGS identification of fungi potentially implicated in the infection of Aquilaria*, 23 and 24 November 2016, 5ième Edition Internationale de la Cosmetopée, Punaauia Catering and Hospitality College, Tahiti.

Dix Rapports scientifiques et économiques

- Zaremski A. Rapport final d'exécution (2021) *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*. 52 p.
- Roubaud F, Rinna K, Schaer Burkhard (2021) Rapport économique final : *Etude de faisabilité de la mise en place d'une filière d'huiles essentielles d'Aquilaria en Guyane*. 37p.
- Amusant N (2020) Rapport : *Valorisation des feuilles dans le secteur de la tisanderie : quelles approches méthodologiques pour appréhender la signature chimique des feuilles ?* 68 p.
- Zaremski A (2020) Rapport d'exécution Intermédiaire du 1er janvier 2019 au 31 décembre 2019. *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*. 23 p.
- Zaremski A, Leroy T, Ducouso M, Zaremski C, Michaloud G, Cao Van P (2020). Rapport : *Les relations avec le Laos : Guide des pratiques*. 50 p.
- Sue Hu, Didier Tcha, Pierre Tcha, Hu Ya, Zaremski A (2020) Rapport : *Contribution des agriculteurs de Régina et de Cacao dans la mise en place de la filière Aquilaria en Guyane*. 60 p.
- Michaloud G, Andary C (2020) Rapport : *Contribution des experts scientifiques dans la mise en place de la filière Aquilaria en Guyane*. 23 p.
- Roubaud F, Rinna K, Schaer Burkhard (2019) Rapport économique : *Etude de faisabilité de la mise en place d'une filière d'huiles essentielles d'Aquilaria en Guyane*. 30p.
- 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.
- Morcillo F, Ilbert P, Labeyrie A, Zaremski C, Zaremski A (2018). Rapport : *Elaboration d'une méthodologie pour une production de cals d'Aquilaria*. Agritrop Cirad, Montpellier, 15p.

Assises de l'agriculture en Guyane, Presse, Fête de la Science, interviews, télévision, flyer,....

- Janvier Février 2021- Les Assises de l'Agriculture (La Suite). Le projet Aquil@Guyane-Point d'étape ; Le Mag N°6, p 49.
- Novembre Décembre 2020- Les Assises de l'Agriculture. La Guyane agricole sur la ligne di départ (GDI) ; Le Mag N°5, p 33-37.
- Les assises de l'Agriculture de Guyane, Cayenne, 30 nov -1er déc. <https://aquilaria.cirad.fr/content/download/4407/32467/version/4/file/Les+assises+de+l%27agriculture+Guyane+2020.pdf>.
- 2020- **La ferme expérimentale : valoriser les ressources naturelles guyanaises.** <https://www.ewag.fr/2020/01/ferme-experimentale-gdi/>
- 1 mars 2020- Un projet d'avenir : La production de bois d'Aquilaria et ses produits dérivés. Le magazine agricole de Guyane ; Le Mag N°1 Mars 2020.
- 6 février 2020- Projet Aquil@Guyane : présentation du bilan de la phase 2 en comité de pilotage à Cacao exposée par Alba Zaremski. [https://www.ctguyane.fr/projet-aquilguyane-presentation-du-bilan-de-la-phase-2-en-comite-de-pilotage-a-cacao/?utm_source=feedburner&utm_medium=email&utm_campaign=Feed%3A+CTGuyane+\(Collectivit%C3%A9+Territoriale+de+Guyane\)](https://www.ctguyane.fr/projet-aquilguyane-presentation-du-bilan-de-la-phase-2-en-comite-de-pilotage-a-cacao/?utm_source=feedburner&utm_medium=email&utm_campaign=Feed%3A+CTGuyane+(Collectivit%C3%A9+Territoriale+de+Guyane)).
- Zaremski C, Ducouso A (2017) Fête de la Science à l'Université de Guyane- 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/>
- Zaremski C (2017) - Afterwork : « C'est quoi cette science », Guyane Développement Innovation. (10 octobre 2017).
- Zaremski C, Ducouso 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>.
- Zaremski C (2018) Ma thèse en 180 Secondes - Classement au concours final régional de Guyane : 3ème. - <https://www.youtube.com/watch?v=8m86TKwCe0A>

Visite des autorités dans les parcelles expérimentales de Cacao et de Régina :

- De la Collectivité Territoriale de Guyane, Chambre d'agriculture et du maire de Régina



Visite des autorités dans les parcelles expérimentales

Mr Rodolphe Alexandre, Président de la Collectivité Territoriale de Guyane, accompagné du Président de la Chambre d'agriculture, Mr Alain Siong, du maire de Régina, Mr Pierre Désert et de l'équipe Aquilaria.

- De la Ministre de l'Outre-Mer accompagnée du Préfet et des élus de Cacao



Visite de la Ministre de l'Outre-Mer, Madame Annick Girardin, accompagnée du Préfet Monsieur Marc Del Grande, des élus et de l'équipe Aquilaria.

Création du site Web du projet Aquil@Guyane :

<https://aquilaria.cirad.fr>



- Publicité



6. Perspectives

La phase 3 consistera en la mise en place d'une filière « Agarwood » en Guyane.

Ce sera la préparation du dispositif de production industrielle des huiles essentielles d'Agarwood ou de bois sain et de poudre de feuilles « infusion-santé ». La qualité devra répondre à l'excellence demandée par les professionnels et pourra faire l'objet d'un Label « Guyane ». Cette phase, centrée sur la recherche à la suite des phases précédentes, devra faire le lien entre la recherche et la mise en production agricole industrielle.

Cette phase 3 a vocation à élargir l'accès à la culture d'Aquilaria à de nouveaux agriculteurs guyanais afin de développer une véritable filière à court terme sur le territoire. Par ailleurs, la protection de la biodiversité de l'environnement naturel et le respect du partage et des avantages sont au centre de nos préoccupations pour la poursuite de ce projet.

Au cours de la 2ième phase, la CTG s'est rapprochée de la Cosmetic Valley.

Ce rapprochement devra permettre l'ouverture vers des débouchés industriels locaux et internationaux pour les productions.



Stand de la CTG et GDI à la Cosmetic 360, Conférence organisée par la Cosmetic Valley du 15 au 16 octobre 2019 à Paris.