



**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO**

**FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES**



MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES  
BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES



**Option : PHYSIOLOGIE VEGETALE**



**Evaluation de l'activité répulsive de l'huile essentielle de pulpe de rotra, *Syzygium cumini* L. (MYRTACEAE), contre l'insecte dévoreur de graines *Myocalandra signatella***

Présenté par :

**Stelina RASAMIMANANA**

**Maître ès Sciences**

Soutenu publiquement le 14 Août 2009

Devant la commission d'examen composée de :

**Président : Professeur RAMAVOVLONA**

**Rapporteur : Docteur Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA**

**Examineurs : Docteur Isabelle RATSIMALA RAMONTA**

**Docteur Lala RAVELOSON RAVAOMANARIVO**

# SOMMAIRE

## REMERCIEMENTS

LISTE DES ABREVIATIONS

GLOSSAIRES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ANNEXES

**INTRODUCTION ..... 1**

**GENERALITES ..... 4**

**I *Syzygium cumini* L. .... 5**

I.1 Systématique ..... 5

I.2 Description botanique ..... 5

I.3 Distribution géographique ..... 6

I.4 Biologie et écologie ..... 7

I.5 Insectes nuisibles et maladies ..... 7

I.6 Utilisation de la plante ..... 7

I.7 Chaîne d'approvisionnement en graines de rotra..... 8

**II L'insecte *Myocalandra signatella* ..... 10**

II.1 Classification ..... 10

II.2 Description de l'insecte ..... 10

II.3 Biologie ..... 11

II.4 Dégâts causés par l'insecte ..... 11

II.5 Moyens de lutte ..... 11

II.5.1 Méthodes de lutte traditionnelles..... 11

II.5.2 Méthodes de lutte modernes ..... 12

**III Les Huiles essentielles ..... 12**

III.1 Définition ..... 12

III.2 Lieu de synthèse ..... 13

III.3 Procédés d'extraction ..... 13

III.4 Caractéristiques générales des huiles essentielles ..... 15

III.5 Composition chimique ..... 15

III.6 Facteurs influant sur la composition d'une huile essentielle..... 16

III.7 Utilisation des huiles essentielles ..... 16

III.8 La chromatographie en phase gazeuse .....	16
III.8.1 Définition .....	16
III.8.2 Principe.....	17
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>18</b>
<b>I Matériel.....</b>	<b>19</b>
I.1 Matériel végétal .....	19
I.2 Matériel biologique .....	19
<b>II Méthodes.....</b>	<b>19</b>
II.1 Evaluation de l'infestation des fruits .....	19
II.2 Test d'affinité de l'insecte .....	20
II.3 Caractérisation des fruits de rotra au cours de leur maturation .....	20
II.3.1 Caractérisation des différents stades de maturation .....	20
II.3.2 Caractéristiques morphométriques .....	21
II.3.3 Caractéristiques physico-chimiques .....	22
II.3.3.1 Acidité titrable .....	22
II.3.3.2 Total des Solides Solubles (TSS) .....	22
II.3.3.3 Dosage des chlorophylles .....	22
II.3.3.4 Dosage des anthocyanes .....	23
II.3.3.5 Extraction et analyse des huiles essentielles.....	23
II.4 Tests biologiques .....	25
II.4.1 Principes .....	25
II.4.2 Test de répulsivité.....	25
II.4.4 Tests de spécificité.....	27
II.4.4.1 Test de différentes huiles essentielles.....	27
II.4.4.2 Test sur <i>Sitophilus oryzae</i> .....	27
II.4.5 Substitution.....	27
<b>RESULTATS.....</b>	<b>28</b>
<b>I Infestation des fruits au cours de la maturation.....</b>	<b>29</b>
<b>II Affinité de <i>Myocalandra signatella</i> pour les fruits de rotra.....</b>	<b>29</b>
<b>III Caractéristiques morphométriques des fruits de rotra.....</b>	<b>30</b>
III.1 Proportions relatives des différents stades de maturation .....	30
III.2 Poids .....	32
III.3 Longueur et diamètre .....	32

<b>IV Caractérisations physico-chimiques de la pulpe de rotra .....</b>	<b>33</b>
IV.1 Teneur en eau (TE) .....	33
IV.2 Acidité titrable.....	33
IV.3 Total des Solides Solubles (TSS%) .....	34
IV.4 Teneurs en chlorophylles et en anthocyanes totaux.....	34
IV.5 Rendement en huile essentielle .....	35
IV.6 Variation qualitative de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra.....	35
<b>V. Résultats des tests biologiques.....</b>	<b>37</b>
V.1 Effet répulsif de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra contre <i>M. signatella</i> .....	37
V.2 Effet toxique de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra contre <i>M. signatella</i> .....	38
V.3 Effet répulsif d'autres huiles essentielles contre <i>M. signatella</i> .....	38
V.4 Effet répulsif de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre <i>Sitophilus oryzae</i> .....	39
<b>DISCUSSIONS.....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCES WEBIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>55</b>
<b>ANNEXES</b>	

## *REMERCIEMENTS*

☞ Grâce au Seigneur tout puissant pour avoir accordé sa bonté et sa bénédiction tout au long de ma vie et m'a permis d'arriver au seuil de ce mémoire. Gloire à Dieu !

La réalisation de ce mémoire, qui est le fruit de la collaboration entre l'IMRA et le Département de Biologie et Ecologie Végétales, n'a été possible sans l'aide et la participation de nombreuses personnes.

Nos remerciements les plus sincères vont à l'encontre des membres du jury :

☞ *Professeur RAMAVOVOLOLONA*, Enseignant-chercheur, Responsable du 3<sup>ème</sup> cycle en Physiologie Végétale et de la formation doctorale au Département de Biologie et Ecologie Végétales à la Faculté des Sciences, qui a bien voulu présider le jury de la présente mémoire et pour ses précieuses suggestions dans l'amélioration de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de notre haute considération.

☞ *Docteur Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA*, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, qui a bien voulu accepter de m'encadrer pendant ce travail, pour sa disponibilité, son aide, sa motivation et ses conseils tout au long de la réalisation et de la rédaction de ce travail. Qu'il reçoive ici nos plus vifs remerciements.

☞ *Docteur Isabelle RATSIMIALA RAMONTA*, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences qui a bien voulu siéger parmi les membres du jury en tant qu'examineur malgré ses lourdes responsabilités. Qu'elle trouve ici le témoignage de notre gratitude.

☞ *Docteur Lala RAVELOSON RAVAOMANARIVO*, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, Chef du Département Entomologie, qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail et n'a ménagé ni son temps ni son expérience. Qu'elle soit assurée de notre respect.

Nous souhaitons également adresser nos sentiments de reconnaissance :

☞ Au Professeur Suzanne RATSIMAMANGA, Présidente de l'IMRA, qui a bien voulu accorder notre demande de stage au sein de l'institut, en vue de la préparation du Diplôme d'Etudes Approfondies et pour son soutien financier dans le cadre de ce projet.

☞ Au personnel du Laboratoire d'Analyses des Huiles essentielles de l'IMRA, dirigé par *Monsieur Delphin RABEHAJA*, qui nous a prêté main-forte avec leur aide et leur assistance durant tous les travaux d'extraction et d'analyse des huiles essentielles.

☞ A l'équipe de l'Unité de Recherche sur la Récolte et les Traitements Post-Récoltes de l'IMRA pour son aide et qui ont fait que chacun de nos jours de travail ait été plus agréable.

☞ Au personnel du Département d'Entomologie de la Faculté des Sciences et du PBZT qui a permis d'identifier les insectes.

☞ Au personnel du laboratoire de Physiologie végétale qui nous a permis de réaliser les études physico-chimiques.

☞ A toutes les personnes qui nous ont aidés à effectuer les récoltes.

☞ A tous les enseignants du Département de Biologie et Ecologie Végétales de la Faculté des Sciences d'Antananarivo, pour leurs directives tout au long de ces années universitaires.

☞ A mes amis de promotion pour les sympathiques moments que nous avons passés ensemble.

☞ A mes parents, mes frères et à Dina pour leurs soutiens permanents malgré la distance. Je vous remercie éternellement.

☞ A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Que Dieu récompense vos efforts !*

## LISTE DES ABBREVIATIONS

**AFNOR** : Association Française de la Normalisation

**CNRS** : Centre National de la Recherche Scientifique

**CPG/DIF** : Chromatographie en Phase Gazeuse/ Détecteur à Ionisation de Flamme

**D.O** : Densité optique

**DVRN** : Direction de la Valorisation des Ressources Naturelles

**EMAG** : Esters Méthyliques d'Acides Gras

**HR** : Humidité relative

**IMRA** : Institut Malgache de Recherches Appliquées

**LAHE** : Laboratoire d'Analyse des Huiles Essentielles

**min** : Minute

**P<sub>HE</sub>** : Poids huile essentielle recueillie

**P<sub>m</sub>**: Poids frais du matériel végétal utilisé

**PMF** : Poids de la Matière Fraîche

**PMS** : Poids de la Matière Sèche

**Rdt** : Rendement en huile essentielle

**T°**: Température

**TE** : Teneur en eau

**TSS** : Total de Solides Solubles

## GLOSSAIRES

**Stomachique** : qui favorise la digestion

**Véraison** : qui correspond à un démarrage de la maturation du fruit. La véraison de tous les fruits n'est pas simultanée: sur une même grappe, des baies sont encore vertes et dures, d'autres sont vertes et molles, alors que certaines commencent à se colorer.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Pied de rotra âgé d'une trentaine d'années (IMRA à Avarabohitra Itaosy).....	5
<b>Figure 2a:</b> Fleurs et feuilles de rotra.....	6
<b>Figure 2b:</b> Fruits de rotra.....	6
<b>Figure 3:</b> Diagramme montrant la chaîne d'approvisionnement en graines de rotra jusqu'à sa transformation en Madeglucyl® .....	9
<b>Figure 4:</b> Individus adultes de <i>Myocalandra. signatella</i> et de <i>Sitophilus oryzae</i> .....	10
<b>Figure 5:</b> Métamorphose complète d'une larve de <i>Sitophilus oryzae</i> jusqu'au stade adulte.....	11
<b>Figure 6:</b> Glande sécrétrice chargée d'huile essentielle mêlée à des trichomes .....	13
<b>Figure 7:</b> Appareil sécréteur (calice d'une fleur de lavande).....	13
<b>Figure 8:</b> Diagramme simplifié montrant les étapes successives de la séparation des différents composants d'une huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse .....	17
<b>Figure 9:</b> Lot de fruits montrant les symptômes d'une infestation par l'insecte au niveau de la pulpe (encerclé en jaune) .....	19
<b>Figure 10:</b> Lot de fruits récolté à un temps donné au cours de la fructification montrant les différents stades de maturation .....	21
<b>Figure 11:</b> Cocotte minute transformée en extracteur d'huile essentielle .....	24
<b>Figure 12 :</b> Extracteur d'huile essentielle de type Clevenger .....	24
<b>Figure 13:</b> Chromatographe de marque 8000 Top avec injecteur automatique.....	25
<b>Figure 14:</b> Test de répulsivité contre les adultes de <i>Myocalandra signatella</i> .....	26
<b>Figure 15</b> Comparaison du pourcentage d'infestation des fruits de rotra au cours de la maturation (n=50).....	29
<b>Figure 16 (a-e):</b> Variation des différents stades de maturation des fruits de rotra au cours des semaines 1, 3, 6, 9 et 12, (n=250) .....	31
<b>Figure 17:</b> Variation du poids de la matière fraîche (PMF) du fruit de rotra au cours de la maturation. Barre = $IC_{\alpha=5\%}$ .....	32
<b>Figure 18:</b> Evolution de la longueur et du diamètre des fruits de rotra au cours de la maturation. Barre = $IC_{\alpha=5\%}$ .....	32
<b>Figure 19:</b> Variation de la teneur en eau (TE) de la pulpe de rotra au cours de la maturation. Barre = $IC_{\alpha=5\%}$ .....	33
<b>Figure 20:</b> Variation de l'acidité de la pulpe de rotra au cours de la maturation des fruits.....	33
<b>Figure 21:</b> Variation du total de solides solubles (TSS) de la pulpe de rotra au cours de la maturation des fruits.....	34
<b>Figure 22:</b> Variation des teneurs en chlorophylles et en anthocyanes totaux de la pulpe de rotra au cours de la maturation .....	34
<b>Figure 23:</b> Variation du rendement en huile essentielle de pulpe de rotra au cours de la maturation. ....	35
<b>Figure 24:</b> Effet de la dilution sur la répulsivité de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre <i>Sitophilus oryzae</i> .....	40

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Affinité de <i>Myocalandra signatella</i> pour les fruits de rotra « mûrs » et « verts ». Les insectes qui ne se trouvent pas sur un fruit après 24 heures sont classés « neutres » .....	30
<b>Tableau 2:</b> Affinité de <i>Myocalandra signatella</i> pour les graines de rotra « mûrs » et « verts ». Les insectes qui ne se trouvent pas sur un fruit après 24 heures sont classés « neutres » .....	30
<b>Tableau 3:</b> Variation des teneurs relatives des constituants chimiques de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra au cours de la maturation.....	36
<b>Tableau 4:</b> Résultats de l'analyse de variances de l'effet de la dilution et de la période de récolte des fruits sur la répulsivité de l'huile essentielle de pulpe de rotra.....	37
<b>Tableau 5:</b> Pourcentage de répulsivité de l'huile essentielle de pulpe de rotra extraite à différents temps de la maturation contre <i>Myocalandra signatella</i> .....	37
<b>Tableau 6:</b> Mortalité de <i>Myocalandra signatella</i> exposés pendant différents temps à l'huile essentielle de pulpe de rotra .....	38
<b>Tableau 7:</b> Pourcentage de répulsivité de différentes huiles essentielles contre <i>Myocalandra signatella</i> .....	39

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1 :</b> Conditions opératoires	
<b>Annexe 2 :</b> Identification des constituants	
<b>Annexe 3 :</b> Liste des constituants chimiques non identifiés de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra au cours de la maturation	
<b>Annexe 4 :</b> Structure de quelques constituants chimiques des huiles essentielles	
<b>Annexe 5 :</b> Teneur relative des constituants chimiques des huiles essentielles de substitution	

# Introduction

## INTRODUCTION

Plante introduite à Madagascar, c'est vers l'année 1957 que le Pr. Albert Rakoto-Ratsimamanga et ses collaborateurs s'intéressaient à *Syzygium cumini* L. Ils ont recherché de nouvelles substances actives, à partir des graines de cette plante, à l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) mais également au Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) à Paris. Vingt cinq ans plus tard, l'équipe a mis au point une spécialité antidiabétique appelée Madeglucyl<sup>®</sup> à partir de graines de *Syzygium cumini* et a pu démontrer ses activités hypoglycémiantes et antidiabétiques aussi bien sur l'animal qu'en clinique humaine (Ratsimamanga et al., 1999). Cette préparation a obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché portant n° 011.5.3.95 du 18 Décembre 1997 à Madagascar.

Cependant, les graines utilisées pour la préparation de Madeglucyl<sup>®</sup> sont attaquées par des insectes nuisibles se manifestant principalement pendant le stockage des graines, causant de sérieux dommages. *Myocalandra signatella*, de la famille des Curculionidae, figure parmi les insectes dévoreurs trouvés dans les stocks de graines de *Syzygium cumini*. Selon Baloch (1992), les Curculionidae sont des insectes nuisibles des graines stockées et des produits qui en dérivent. L'estimation de tous les dommages causés par les insectes sur les graines stockées est de 10-40% de perte annuelle dans le monde (Matthews et Hislop, 1993). Pour éviter l'infestation des stocks de graines et des produits qui en dérivent, nombreux insecticides synthétiques ont été utilisés. Cependant, une acquisition d'une certaine résistance contre la plupart de ces substances a été rapportée chez plusieurs insectes (Jembere et al., 1995). Ainsi, l'utilisation incontrôlée de ces produits synthétiques peut entraîner des impacts négatifs sur l'environnement et pourrait causer des variations comportementales de l'insecte (Gupta et al., 2001). Donc, il est nécessaire de développer de nouvelles alternatives comme l'application simultanée de traitements insecticides et de répulsifs.

Les répulsifs peuvent être considérés comme des substances actives agissant sur des insectes susceptibles de véhiculer des germes de maladies (Peterson et al., 2001). L'utilisation des insecticides dérivés de plantes a joué un rôle important dans la méthode traditionnelle de lutte contre les insectes nuisibles en Afrique et en Asie (Hassanali et al., 1990; Niber, 1994; Bekele et Hassanali, 2001). A cet égard, plusieurs substances contenues dans les plantes ont été évaluées pour leur propriété toxique et répulsive contre les insectes des graines stockées, spécialement sous forme d'huiles essentielles. En effet, les constituants des huiles volatiles de plantes sont connus depuis longtemps comme ayant des actions sur le comportement des insectes nuisibles. Ces effets sont dus à la présence de terpénoïdes, comprenant les

monoterpènes, sesquiterpènes et autres éléments (Beek et Groot, 1986; Palevich et Cracker, 1994).

La qualité du stock de graines de *Syzygium cumini* destinée à la fabrication de Madeglucyl<sup>®</sup> dépend étroitement de la chaîne d'approvisionnement allant de la récolte par les paysans jusqu'à la livraison des graines à la manufacture. Le présent projet s'inscrit dans une démarche qualité de la manufacture visant à réduire les risques d'infestation de la matière première nécessaire à la production de phytomédicaments.

L'objectif général du projet est de répondre aux problèmes posés par la Soamadina sur la protection du stock de graines de rotra destinées à la fabrication de l'antidiabétique Madeglucyl<sup>®</sup> contre l'infestation par des insectes.

Afin de résoudre ce problème, notre étude consistera à :

- ✓ Identifier, en premier lieu, l'étape critique au cours de laquelle survient l'infestation des lots de graines de rotra par *M. signatella* ;
- ✓ Tester au laboratoire la préférence de *M. signatella* pour les fruits récoltés à différents stades de maturation. En effet, les fruits verts tombés par terre ne sont que très rarement attaqués par les insectes contrairement aux fruits mûrs. Ce qui suggère la présence de substances répulsives dans les fruits verts et particulièrement au niveau de la pulpe ;
- ✓ Suivre les variations quantitatives et qualitatives de l'huile essentielle de pulpe de rotra au cours de la maturation ;
- ✓ Tester la répulsivité d'huiles essentielles obtenues à différents stades de la maturation contre *M. signatella* ;
- ✓ Tester d'autres huiles essentielles connues ou non pour leur activité répulsive mais pouvant remplacer l'huile de pulpe de rotra qui n'est disponible que pendant la fructification ;
- ✓ Tester la spécificité de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre d'autres insectes dévoreurs de graines.

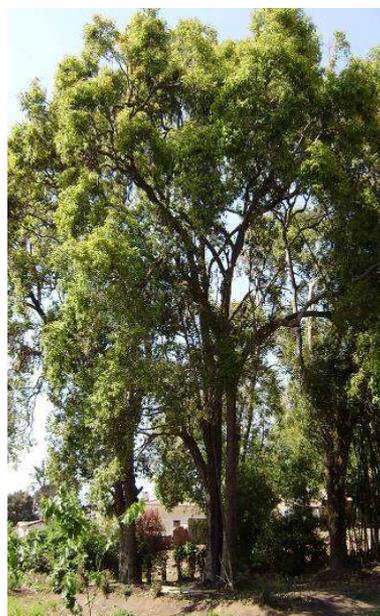
# Généralités

## I *Syzygium cumini* L.

*Syzygium cumini* L. ou rotra est une plante d'origine Indo-Malaisienne (Morton, 1987). Elle est très anciennement introduite à Madagascar où elle est naturalisée (Boiteau, 1985).

### I.1 Systématique

<b>Règne :</b>	VEGETAL
<b>Sous- règne :</b>	TRACHEOBIONTA
<b>Embranchement :</b>	SPERMATOPHYTA
<b>Division :</b>	MAGNOLIOPHYTA
<b>Classe :</b>	MAGNOLIOPSIDA
<b>Sous-classe :</b>	ROSIDAE
<b>Ordre :</b>	MYRTALES
<b>Famille :</b>	MYRTACEAE
<b>Genre :</b>	<i>Syzygium</i>
<b>Espèce :</b>	<i>cumini</i> (L.) Skeels



**Figure 1:** Un pied de rotra âgé d'une trentaine d'années (IMRA à Avarabohitra Itaosy)

**Synonymes:** *Eugenia cumini* (L.) Druce, *Eugenia jambolana* Lamk., *Jambolifera sinensis* Spreng., *Myrtus cumini* L., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Calyptanthus jambolana* Willd.

**Noms vernaculaires:** Rotra (dans toute l'île malgache), Robazaha (Betsileo), Rotrambazaha (Merina), Varotra (Betsileo), Jamblon, Jamélongue (Français), Black plum, Jambolan, Java plum (Anglais), Jamun, Jambul (Inde, Malaisie), etc...

### I.2 Description botanique

*Syzygium cumini* ou « Rotra », est un arbre (Figure 1) qui pousse rapidement, atteignant une taille maximale en 40 ans. Le diamètre du tronc varie de 0,6 à 0,9 m. L'écorce, dans les parties basses de l'arbre est rugueux, craquelé, écaillé et décoloré; vue de loin, son aspect est lisse et gris lumineux. Les feuilles persistantes, opposées, oblongues ovales ou elliptiques mesurent de 5 à 25 cm de long et 2,5 à 10 cm de large. Les fleurs se colorent en blanc d'abord, puis rose et se présentent sous forme de grappe de 1,25 cm de large et 2,5 cm ou plus de long (Figure 2a). Les fruits ronds ou oblongues sont généralement au nombre de 10 à 40 et en forme de grappe. Ils mesurent de 1,25 à 5 cm de long, de couleur vert, puis violet

sombre ou presque noir quand ils sont mûrs (Figure 2b). La pulpe est blanche ou violette, très juteuse. Les graines sont de couleur verte ou marron (Morton, 1987).



**Figure 2a:** Fleurs et feuilles de rotra

(Source : <http://plantsdatabase.com/members/Thaumaturgist>)



**Figure 2b:** Fruits de rotra

(Source : <http://www.visiflora.com>)

### I.3 Distribution géographique

C'est une plante tropicale qui est naturalisée à Hawaï (Wagner et al., 1990), Australie, Zanzibar, Pemba, Mombassa et au Kenya (Morton, 1987). Elle se trouve surtout dans les régions de basse altitude, surtout le long des marges des cours d'eau. A Madagascar, le rotra est ainsi localisé sur la Côte-Est et Nosy-Be, Mahajanga et Antsiranana à l'Ouest. Cet arbre est assez commun aux environs de Vohemara, Maroantsetra, Toamasina et Tolagnaro (Boiteau, 1993).

#### I.4 Biologie et écologie

Le rotra se développe sur une grande variété de sols et de formations géologiques: latéritique, sable alluvial, et calcaire oolitique. En général, c'est une plante qui pousse à une température variant de -2 à 48°C, une précipitation entre 900 et 1000 mm et une altitude comprise entre 0 et 1800 m, au cours de l'année. Elle fleurit chaque année, principalement au printemps et fructifie à partir de sa cinquième ou sixième année. Les graines polyembryonnaires servent de matériel de propagation et sont dispersées par les oiseaux et les mammifères. Le rotra requiert un climat humide, mais pour la floraison et la fructification, elle préfère une période sèche. En revanche, les fruits sont mûrs pendant la période des pluies ([http:// www.worldagroforestrycentre.org](http://www.worldagroforestrycentre.org)).

Dans l'île, la saison de fructification est de Janvier à Avril et chaque pied de rotra produit environ 15 à 180 kg de fruits soit 5 à 60 kg de graines.

#### I.5 Insectes nuisibles et maladies

Le rotra est susceptible aux attaques de divers insectes et maladies. Parmi les insectes ennemis en Inde du sud, les plus nuisibles sont les dévoreurs de feuilles: *Carea subtilis*, *Chrysocraspeda olearia*, *Metanastria hyrtaca* et *Euproctis fraterna*. Ces insectes peuvent causer une défoliation totale. Les fruits sont attaqués par des insectes volants (*Dacus diversus* en Inde) et peuvent être avidement mangés par les oiseaux (Morton, 1987).

Par ailleurs, le rotra peut contracter diverses maladies causées par des champignons:

- ✓ Le « *black leaf spot* » ou tâches noires sur les feuilles par *Asterinella puiggarii* (mycètes)
- ✓ Le « *mushroom root rot* » ou pourriture de racines par *Clitocybe tabescens* (mycètes)

#### I.6 Utilisation de la plante

Les fruits mûrs sont usuellement consommés frais car ils sont juteux. Ils peuvent également être transformés en confiture et même comme ingrédient dans la réalisation de pudding. Les fruits sont aussi utilisés pour la fabrication de vin qui est produit en grande quantité aux Philippines.

L'huile essentielle extraite à partir de feuilles est utilisée pour le parfum des savons et elle est mélangée avec d'autres matériels pour la préparation de parfums.

Les fleurs sont riches en nectar et donnent de bons rendements et une meilleure qualité au miel ([http:// www.issg.org/database/species/ecology](http://www.issg.org/database/species/ecology)).

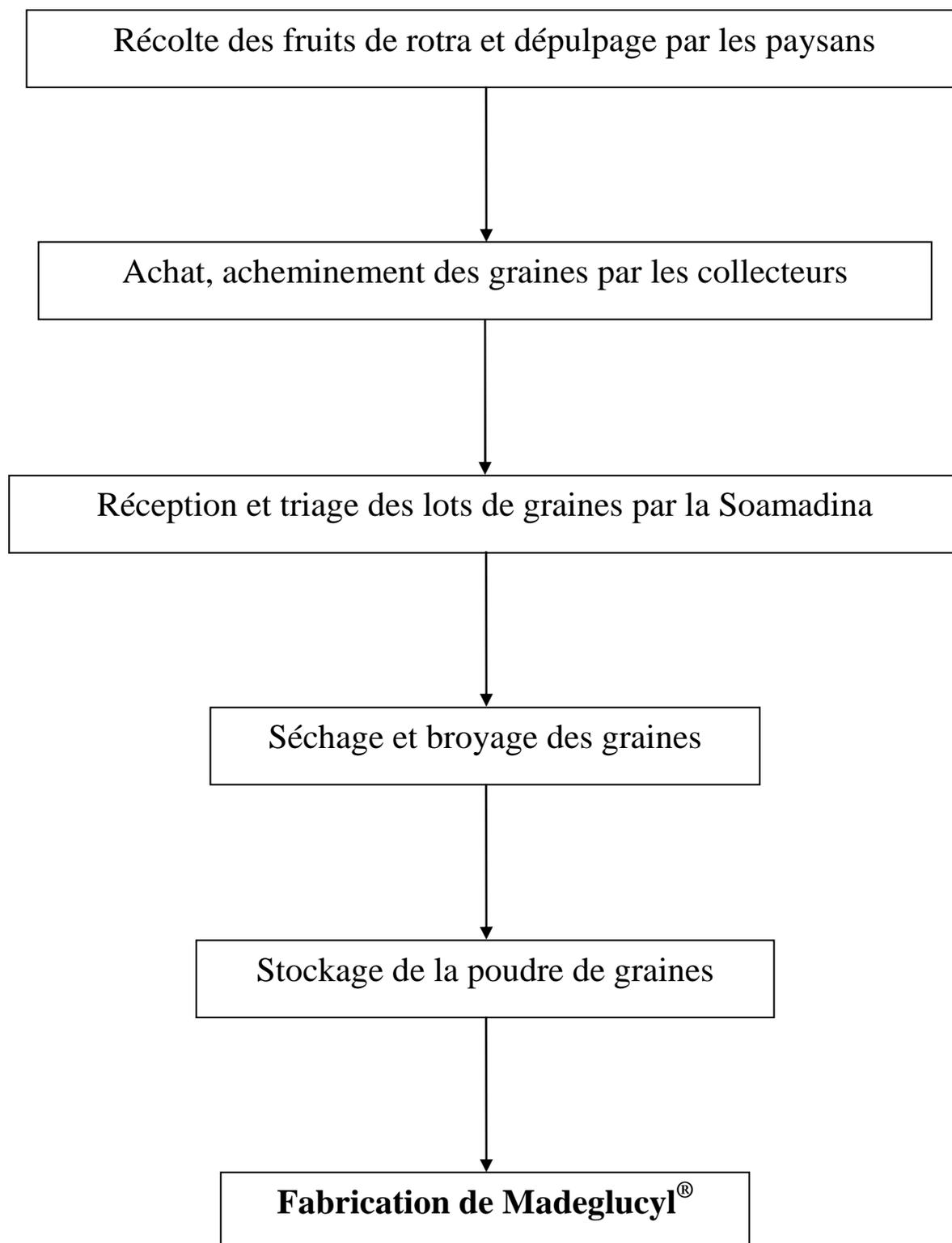
Le bois gris-rougeâtre est utilisé en menuiserie et en charpenterie. Le bois est résistant aux termites, et bien que difficile à travailler, il est utilisé pour la construction de bateaux, outils agricoles, charrettes, traverses, contreplaqués et comme support pour les galeries des mines. Il est également utilisé pour construire les ponts et fabriquer des instruments musicaux, spécialement la guitare.

En Inde, les graines de rotra sont largement utilisées en médecine traditionnelle contre le diabète (Kumar et al., 2008). Pendant la deuxième guerre mondiale, quand Madagascar fût privé d'insuline pour le traitement des diabétiques, la poudre de rotra était utilisée. L'écorce de rotra présente une activité anti-inflammatoire (Muruganandan et al., 2001). Les fruits sont stomachiques, diurétiques et le jus sert à apaiser les diarrhées aiguës. En Inde, le jus, la décoction ou le vinaigre des fruits mûrs de rotra peuvent être administré pour apaiser la diarrhée chronique. Les graines et l'écorce sont bien connues au Far-Ouest pour le traitement de la dysenterie. L'écorce astringente peut être utilisée pour se gargariser et les fruits sont utilisés pour atténuer la colique.

### **I.7 Chaîne d'approvisionnement en graines de rotra**

Le déroulement de cette chaîne destinée à la fabrication de phytomédicaments est détaillé dans la figure 3. Elle commence par la récolte des fruits par des paysans dans la région Alaotra-Mangoro (Ambatondrazaka), Boeny (Marovoay) et Itasy. Cette première étape est suivie du dépulpage des fruits (afin de récupérer les graines). Les graines déulpées sont achetées entre 400 et 2000 Ar/kg par la Soamadina (usine de fabrication de phytomédicaments sis à Avarabohitra Itaosy) par l'intermédiaire des collecteurs. Les lots de graines sont ensuite triés, séchés, broyés et stockés sous-forme de poudre servant à la fabrication de Madeglucyl<sup>®</sup>, dont la production annuelle est d'environ 1,4T.

Actuellement, les graines de rotra intéressent des industriels européens. En effet, Madagascar exporte ces graines dans certains pays tels que l'Italie (INDENA), la Suisse et l'île Maurice. Selon les données obtenues auprès de la DVRN, l'exportation annuelle de graines de rotra varie entre 150 et 300 Kg entre 2000 et 2002.



**Figure 3:** Diagramme montrant la chaîne d’approvisionnement en graines de rotra jusqu’à sa transformation en Madeglucyl®

## II L'insecte *Myocalandra signatella*

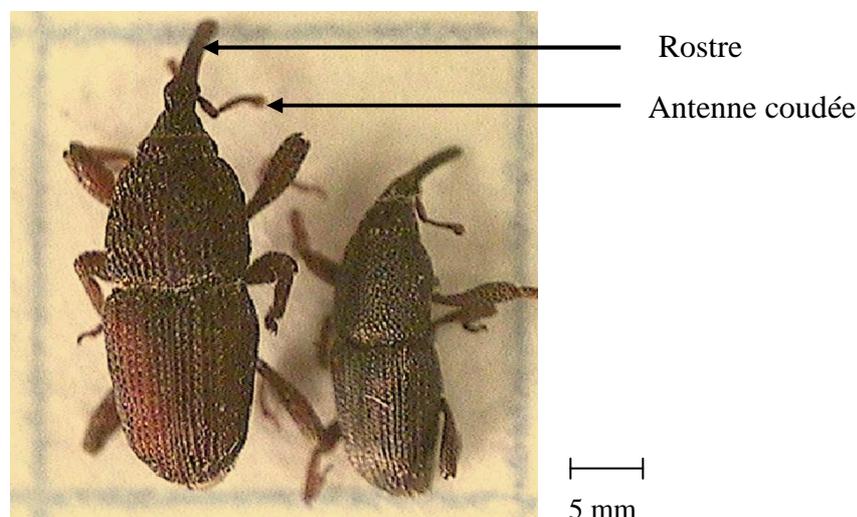
*Myocalandra signatella* est une espèce apparentée au genre *Sitophilus*. L'insecte a été isolé de lots de graines de rotra provenant dans les régions d'Alaotra-Mangoro et de Boeny mais, contrairement à *Sitophilus*, sa présence dans toute l'île n'est pas encore établie (Anonyme, 1992).

### II.1 Classification

<b>Règne :</b>	Animal
<b>Embranchement :</b>	Arthropodes
<b>Classe :</b>	Insectes
<b>Ordre :</b>	Coléoptères
<b>Famille :</b>	Curculionidae
<b>Genre :</b>	<i>Myocalandra</i>
<b>Espèce :</b>	<i>signatella</i>

### II.2 Description de l'insecte

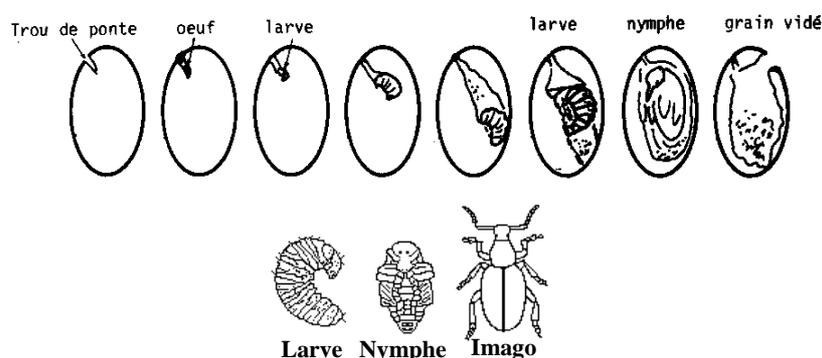
*Myocalandra signatella* est un coléoptère (ordre d'insectes dont la caractéristique la plus visible est la présence d'élytres, ailes antérieures dures qui recouvrent le dessus de l'abdomen lorsque l'insecte est au repos) comparable au charançon du riz, *Sitophilus oryzae*, par sa biologie, sa forme et son comportement mais différent par sa taille et par les caractéristiques de son élytre. *M. signatella* est plus grand (3 à 5 mm), sans taches sur les élytres alors que *Sitophilus oryzae* ne mesure que 2,5 à 3,5 mm de long et présente quatre taches rougeâtres sur les élytres. Les Curculionidae ont la tête prolongée par un rostre (sorte de bec) muni de pièces buccales puissantes. Ils sont reconnaissables grâce à leurs antennes coudées ainsi qu'à leur forme plus ou moins cylindrique et leur corps assez luisant de couleur brun foncé à noir ([http:// www.wikipedia.org/wiki/Curculionidae](http://www.wikipedia.org/wiki/Curculionidae)).



**Figure 4 :** Individus adultes de *Myocalandra signatella* (gauche) et de *Sitophilus oryzae* (droite)

### II.3 Biologie

Le développement de ces insectes dans les graines requiert des conditions optimales : une température de 28°C et une humidité relative égale à 70%. Les insectes adultes (imagos) femelles pondent des œufs. Elles peuvent vivre pendant 6 à 7 mois et déposent jusqu'à 150 œufs, pondus séparément dans les graines. Leur incubation dure de 10 à 15 jours. La larve ronge l'intérieur de la graine. Au bout de trois stades larvaires (15 à 30 jours), elle se nymphose. L'imago émerge au bout d'une semaine. Ce type de développement est une métamorphose complète (Figure 5). Ce cycle s'effectue à l'intérieur des graines. Sa durée varie en fonction des espèces et est fortement influencée par des facteurs externes (Gwinner et al., 1996).



**Figure 5:** Métamorphose complète d'une larve de *Sitophilus oryzae* jusqu'au stade adulte (Source: Cruz et al., 1988)

### II.4 Dégâts causés par l'insecte

Les Curculionidae sont de dangereux parasites des stocks (Gwinner et al., 1996) et certaines espèces peuvent causer des dégâts importants aux diverses cultures ainsi qu'aux récoltes entreposées. Environ 60 000 espèces existent à travers le monde. Les attaques des coléoptères se manifestent, d'une part, par des trous de ponte ou des orifices de sortie des adultes sur les enveloppes des graines et d'autre part, par l'altération, voire la destruction totale du contenu de ces graines ([http:// www.fastonline.org](http://www.fastonline.org)). Ces dégâts ont également été observés avec l'insecte *Myocalandra signatella* lors de l'élevage au laboratoire.

### II.5 Moyens de lutte

#### II.5.1 Méthodes de lutte traditionnelles

➤ **Exposition au soleil:** L'exposition des denrées au rayonnement solaire intense repousse les insectes adultes. Ces derniers ne supportent ni les fortes chaleurs ni la lumière intense (en stock, les insectes se cantonnent souvent dans les zones sombres).

➤ **Enfumage:** Les denrées les plus importantes pour le producteur sont souvent stockées en épis au-dessus des foyers domestiques et sont ainsi enfumées presque en permanence. Cet enfumage (parfois appelé fumigation) éloigne les insectes et empêche la réinfestation (Cruz et al., 1988).

➤ **Utilisation de plantes répulsives:** Dans certaines régions, les graines sont mélangées avec des plantes qui agissent comme insectifuges. Des études sont menées sur certaines d'entre elles (notamment *Azadirachta indica*) pour mieux connaître leurs propriétés et leurs principes actifs (Cruz et al., 1988).

➤ **Conservation en atmosphère confinée:** Elle consiste à appauvrir en oxygène l'atmosphère intergranulaire jusqu'à un taux létal pour les insectes. L'obtention de structures étanches (silo enterré, bidon de 200 l) est le principal obstacle à sa mise en œuvre.

En milieu traditionnel, l'utilisation d'insecticides chimiques de contact se développe de plus en plus, notamment en poudrage ou en pulvérisation (Cruz et al., 1988).

## II.5.2 Méthodes de lutte modernes

➤ **Lutte par le froid :** Au-dessous de 10° C, le développement des insectes est bloqué. En pays tempéré, la ventilation par journées froides permet d'abaisser la température des stocks. Dans les régions chaudes, cette technique coûteuse n'est utilisée que pour le stockage de semences (Cruz et al., 1988).

➤ **Modification de l'atmosphère du milieu:** Il s'agit d'abaisser le taux d'oxygène de l'atmosphère intergranulaire jusqu'à un taux létal pour les insectes (< 1 % d'O<sub>2</sub>). La méthode la plus répandue actuellement reste l'emploi de composés toxiques pour les insectes (Cruz et al., 1988).

➤ **Utilisation des huiles essentielles:** Asawalam et al. (2006) ont démontré les effets répulsifs et insecticides des huiles extraites du poivre noir (*Piper guineense*) contre les charançons du maïs, *Sitophilus zeamais*. Ogendo et al. (2008) rapportent une forte toxicité de l'huile essentielle extraite des feuilles de basilic sauvage (*Ocimum gratissimum*) contre les charançons du riz, *Sitophilus oryzae*.

## III LES HUILES ESSENTIELLES

### III.1 Définition

Selon la norme AFNOR NF.T 75-006, l'huile essentielle est définie comme un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe d'agrumes, soit par distillation sèche. L'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (AFNOR, 1992).

### III.2 Lieu de synthèse

L'embranchement des Spermaphytes comprend le plus souvent des plantes à huiles essentielles. La synthèse et l'accumulation de ces huiles sont généralement associées à la présence de structure histologique spécialisées (Figure 6), souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante: cellules à huile essentielle des Lauraceae ou des Zingiberaceae, les poils sécréteurs des Lamiaceae, les poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae et les canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (Bruneton, 1993).

On trouve les huiles essentielles naturelles dans les fleurs, les fruits, les feuilles, les racines, les graines et les écorces de nombreux végétaux. Mais, il peut y avoir quelques différences au niveau de la composition chimique des essences selon les parties que l'on a distillées même à partir d'une seule plante. L'essence de lavande, par exemple, est obtenue à partir de fleurs (Figure 7), l'essence de patchouli est issue de feuilles et l'essence d'orange provient de fruits (Encyclopédie Encarta 2003). Les essences se forment dans les parties vertes de la plante (constituées de chlorophylle) et sont transportées, lors de la croissance de celle-ci, dans d'autres parties, en particulier dans les pousses donnant des fleurs (Bruneton, 1999).



**Figure 6:** Glande sécrétrice chargée d'huile essentielle mêlée à des trichomes

(Perrin A.et Colson M., 1999)



**Figure 7:** Appareil sécréteur (calice d'une fleur de lavande)

(Perrin A.et Colson M., 1999)

### III.3 Procédés d'extraction

Actuellement, il existe plusieurs méthodes d'extraction d'huiles essentielles mais le choix du procédé est régi selon le type de produits que l'on veut obtenir (Rakotondravony, 2006).

#### ❖ L'expression

C'est une méthode très ancienne qui consiste à récupérer les huiles essentielles contenues dans les écorces fraîches (zestes) des agrumes (citron, pamplemousse, orange). Cette méthode est aujourd'hui améliorée par des procédés semi-manuels ou mécaniques qui permettent d'augmenter et de traiter plusieurs quantités de produits à la fois.

❖ L'enfleurage

Elle utilise des pétales de fleurs fraîches qui sont directement mises en contact avec une couche de matière grasse purifiée ayant pour rôle de retenir le parfum fleuré. Le mélange de l'essence et de la matière grasse donne des « pommades » de haute qualité. Cette technique est très peu utilisée puisqu'elle reste délicate à entreprendre et nécessite un matériel adéquat.

❖ L'entraînement à la vapeur

C'est le procédé le plus employé pour avoir une extraction complète des huiles essentielles à partir d'une matière végétale. Cette méthode est utilisée dans les deux techniques suivantes :

➤ l'hydrodistillation qui consiste à laisser tremper la matière première végétale dans l'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition. Les cellules végétales contenant les substances aromatiques éclatent par turgescence et libèrent l'huile. La vapeur chargée d'huile est ensuite condensée dans un réfrigérant. La séparation de l'eau et de l'huile se produit au niveau d'un essencier par différence de densité.

➤ l'hydrodiffusion a le même principe que l'hydrodistillation mais le matériel végétal n'est pas immergé dans l'eau. La vapeur d'eau fournie par une chaudière est injectée à faible pression à travers le matériel végétal qui est placé sur la partie inférieure de la cuve de charge.

❖ L'extraction au solvant

Elle est réalisée à l'aide d'un extracteur en utilisant des solvants volatils tels que l'hexane, le dichlorométhane ou l'éthanol. Le matériel végétal est épuisé par pénétration du solvant dans les cellules végétales. Après éclatement de celles-ci, une dissolution des produits aromatiques dans le solvant se déroule. Ensuite, le solvant sera évaporé et les substances grasses du type concrètes, absolues ou oléorésines sont obtenues.

❖ L'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique

Elle permet aussi d'obtenir de l'huile essentielle par le caractère sélectif et facilement éliminable du CO<sub>2</sub>. Cependant, son application reste toujours limitée par son coût très élevé.

### III.4 Caractéristiques générales des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont généralement liquides, faiblement colorées, de densité inférieure à celle de l'eau, à l'exception de quelques essences comme celle du girofle et de la cannelle (Bruneton, 1999). Ces substances sont solubles dans les alcools et les solvants organiques. Elles se différencient des autres huiles par leur volatilité, par leurs propriétés organoleptiques (aspect, couleur, saveur, odeur), par leurs propriétés physiques (densité, indice de réfraction, solubilité dans l'alcool, pouvoir rotatoire), ainsi que par leurs propriétés chimiques (composition chimique, indices d'acides, etc...).

Il est recommandé de stocker les huiles essentielles dans des flacons en verre ambrés ou foncés, de manière à les protéger de la lumière. Il faut également éviter l'ouverture prolongée des flacons. Dans ces conditions, les huiles essentielles se conservent plusieurs années.

### III.5 Composition chimique

Les huiles essentielles présentent une composition chimique très complexe, avec parfois plus d'une centaine de constituants parmi lesquels deux types de composés constituent la presque majorité: les hydrocarbures terpéniques (regroupant les monoterpènes et les sesquiterpènes) et les produits oxygénés (Ratsimanohitra, 2001).

#### ❖ Monoterpènes

Les monoterpènes sont des hydrocarbures terpéniques à deux unités isopréniques ( $2 \times C_5$ ), dont la masse moléculaire est, en général, égale à 136 ( $C_{10}H_{16}$ ). Ils constituent la majeure partie de l'huile essentielle.

#### ❖ Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont des hydrocarbures à trois unités isopréniques ( $3 \times C_5$ ), dont la masse moléculaire est égale à 204 ( $C_{15}H_{24}$ ).

#### ❖ Produits oxygénés

Les produits oxygénés regroupent les monoterpénols  $C_{10}H_{28}O$  de masse moléculaire égale à 164, les sesquiterpénols  $C_{15}H_{26}O$  de masse moléculaire 222, les oxydes de sesquiterpènes, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les époxydes, les esters, etc...).

### III.6 Facteurs influant sur la composition d'une huile essentielle

Plusieurs facteurs régissent la composition chimique et le rendement en huiles essentielles, entre autres: l'environnement, le génotype, la variété botanique, la période de récolte, les conditions de la collecte, la température et la durée de séchage, les parasites, les mauvaises herbes et la méthode de distillation (Svoboda et al., 1999; Ratsimanohitra, 2001). Par ailleurs, les proportions des différents constituants d'une huile essentielle peuvent varier en fonction de l'âge de la plante (Rasendramiadana, 2009). En outre, une même espèce botanique peut présenter des compositions chimiques différentes appelées chémotypes, correspondant généralement au composé majeur. Par exemple, le thym commun, *Thymus vulgaris* peut se présenter sous les chémotypes: thymol, carvacrol, géraniol, linalol, thujanol-4 et alpha-terpinéol.

### III.7 Utilisation des huiles essentielles

L'exploitation des propriétés des huiles essentielles est déjà connue depuis l'antiquité. Les huiles essentielles de nombreuses plantes sont connues pour avoir une activité répulsive et insecticide contre les insectes nuisibles. Celle de la citronnelle (*Cymbopogon nardus*) est un puissant répulsif contre les moustiques ([http:// www.aroma-zone.com](http://www.aroma-zone.com)). A part ces propriétés répulsives, les huiles essentielles sont également connues pour leurs utilisations pharmaceutiques, cosmétiques et médicinales. Par exemple, l'huile essentielle de clous de girofle est un analgésique puissant, particulièrement utile en art dentaire et celle de la menthe poivrée est utilisée contre les maux de tête (Farrer, 2006).

La connaissance approfondie des huiles essentielles et notamment de leurs composants, est indispensable à leur utilisation en industrie et/ou en thérapeutique. Depuis quelques années, les progrès des techniques chromatographiques et de spectrométrie ont permis de bien caractériser la plupart des huiles essentielles trouvées sur le marché.

### III.8 La chromatographie en phase gazeuse

#### III.8.1 Définition

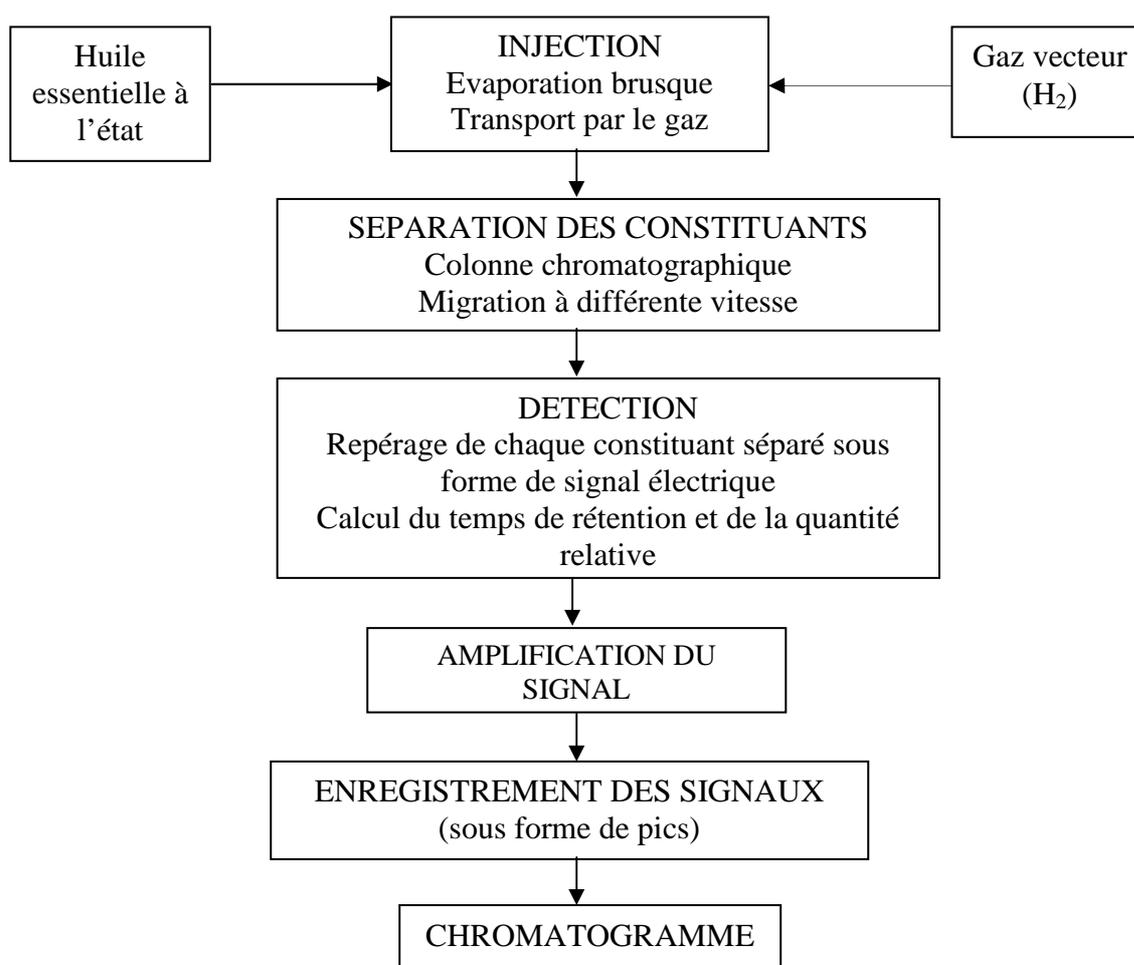
La chromatographie en phase gazeuse (CPG) désigne une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle permet un fractionnement efficace des différents constituants d'un mélange en vue de leur identification (Ramanoelina, 2006).

### III.8.2 Principe

La séparation résulte de la différence de coefficients de partage des divers solutés et se manifeste par des temps de séjour à l'intérieur de la colonne. Le temps de rétention est une constante qui caractérise les composants conformément aux conditions opératoires (Figure 8).

La technique de chromatographie utilisant le Détecteur à Ionisation de Flamme (DIF) permet de doser qualitativement et quantitativement les principaux constituants des mélanges complexes tels que les huiles essentielles. Grâce à cette technique, il est possible de contrôler la qualité des huiles produites et de confirmer leur authenticité.

L'échantillon est introduit par une microseringue dans la chambre d'injection où il est volatilisé instantanément. Il est entraîné, ensuite, par le gaz vecteur dans la colonne qui constitue la pièce maîtresse de l'appareil et où s'effectue la séparation des divers constituants. A la sortie de la colonne, les constituants d'un mélange sont détectés au fur et à mesure de leur élution. Le détecteur transmet des signaux électriques qui sont amplifiés et transcrits sous forme de graphique (chromatogramme) par l'enregistreur. De nos jours, l'enregistreur est un logiciel qui est installée avec un ordinateur lequel sert aussi à exploiter les données.



**Figure 8 :** Diagramme simplifié montrant les étapes successives de la séparation des différents composants d'une huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse.

# Matériels et méthodes

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité répulsive de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre les insectes des stocks de graines. Pour ce faire, la chronologie de l'infestation du lot par l'insecte doit être clairement établie et la préférence de l'insecte vis-à-vis des fruits verts ou mûrs est évaluée. Ensuite, les différents stades de maturation du fruit de rotra sont caractérisés à l'aide de paramètres morphométriques et physico-chimiques. Enfin, les huiles essentielles de pulpe de rotra sont extraites et leur activité répulsive contre *M. signatella* est testée.

## I MATERIEL

### I.1 Matériel végétal

Afin de suivre la maturation des fruits et d'extraire les huiles essentielles de pulpe, les fruits de rotra (*Syzygium cumini* L.) sont récoltés durant les mois de Janvier à Avril 2008 à partir d'un génotype de plus de 30 ans appelé R5 situé dans le jardin botanique de l'IMRA sis à Avarabohitra Itaosy (Altitude : 1633 m, Longitude : 18°55'505''S, Latitude : 47°28'813''E).

### I.2 Matériel biologique

Pour effectuer le test biologique, l'insecte *Myocalandra signatella* est isolé à partir de lots de graines de rotra collectés dans la région de Boeny. L'identification est réalisée de façon indépendante par le Département d'Entomologie de l'Université d'Antananarivo et par celui du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza. L'insecte est multiplié et nourri de graines de rotra dans les conditions du laboratoire ( $T^{\circ}$  ambiante,  $HR \geq 75\%$ ).

## II METHODES

### II.1 Evaluation de l'infestation des fruits

Le pourcentage d'infestation des fruits au cours de la maturation est évalué à partir d'un lot ( $n=50$ ) fraîchement récolté sur l'arbre, d'une part, et ramassé sur le sol, d'autre part. Un fruit est considéré comme infesté quand au moins un trou occasionné par l'insecte est nettement visible au niveau de la pulpe (Figure 9).



**Figure 9:** Lot de fruits montrant les symptômes d'une infestation par l'insecte au niveau de la pulpe (encerclé en jaune).

## II.2 Test d'affinité de l'insecte

Un test d'affinité de *M. signatella* pour les fruits (ou graines) mûrs et verts fraîchement récoltés est effectué. Ce test consiste à disposer dans chaque moitié d'une boîte de Petri ( $\emptyset = 9$  cm) cinq fruits mûrs et cinq fruits verts. Ensuite, dix insectes adultes sont lâchés au milieu de la boîte qui est placée à l'obscurité pendant 24 heures. La préférence pour un stade de maturation donné (mûr ou vert) est déterminée par le nombre d'insectes trouvés sur chaque stade. Les insectes qui ne se trouvent pas sur un fruit au moment du comptage sont classés neutres. Ce test d'affinité a été également répété pour des fruits (ou graines) mûrs et verts séchés à l'étuve (40°C) pendant 72 heures. L'expérience est répétée 6 fois pour chaque traitement ( $n = 70$ ).

## II.3 Caractérisation des fruits de rotra au cours de leur maturation

La maturation des fruits de rotra est très hétérogène, c'est-à-dire qu'à un moment donné de la période de fructification, les fruits se trouvent à différents stades de maturation. Ils ne mûrissent pas en même temps.

Dans cette étude, les récoltes des fruits de rotra sont effectuées chaque semaine à partir du début de la phase de fructification. Cette date est définie comme la période correspondant à l'observation d'un endosperme solide dans plus de 95% des fruits récoltés. Pour l'année 2008, la fructification a commencé le 23 Janvier et s'est terminée le 4 Avril, soit 12 semaines. La dernière semaine de fructification est atteinte lorsque 95% des fruits récoltés sont mûrs.

Chaque semaine de maturation est alors caractérisée par la proportion relative des différents stades mais aussi par les moyennes des paramètres morphométriques et physico-chimiques du lot récolté.

### II.3.1 Caractérisation des différents stades de maturation

Dans cette étude, cinq stades de maturation (Figure 10) du fruit ont été considérés :

- ❖ Stade 1 : vert intense
- ❖ Stade 2 : vert jaune (le fruit passe du vert intense au vert clair)
- ❖ Stade 3 : début de véraison (présence de taches violacées sur moins de la moitié du fruit)
- ❖ Stade 4 : fin de véraison ou fruit violet (présence de taches violacées sur plus de la moitié du fruit)
- ❖ Stade 5 : épiderme noir pourpre



**Figure 10:** Lot de fruits récolté à un temps donné au cours de la fructification montrant les différents stades de maturation

### II.3.2 Caractéristiques morphométriques

Les fruits sont fraîchement récoltés tôt le matin pour limiter la transpiration. La récolte est effectuée sur différents niveaux de l'arbre pour éliminer l'influence de leur positionnement sur la taille et sur la maturation. Ensuite, les paramètres morphométriques incluant le poids frais, la longueur, le diamètre et la teneur en eau sont déterminés.

La teneur en eau est calculée selon la formule:

$$TE = \frac{PMF - PMS}{PMF} \times 100$$

Avec,

TE : la teneur en eau (%)

PMF : le poids de la matière fraîche

PMS : le poids de la matière sèche

### II.3.3 Caractéristiques physico-chimiques

L'étude des paramètres physico-chimiques concerne uniquement la pulpe du fruit de rotra, siège de changements importants comme la couleur, la fermeté et le goût. Pour chaque semaine, 30g de pulpe sont prélevées, broyées jusqu'à obtenir une purée avant d'être resuspendues dans 90ml d'eau distillée. Le mélange est ensuite agité pendant 5 min avant de filtrer pour éliminer les débris. Le jus obtenu est utilisé pour déterminer l'acidité et le taux de solides solubles.

#### II.3.3.1 Acidité titrable

25 ml de jus de pulpe sont dilués dans 25 ml d'eau distillée avant d'être titrés avec une solution de soude 0,1N après avoir ajouté 2 gouttes de phénolphtaléine. L'acidité du jus est proportionnelle au volume de soude nécessaire pour neutraliser tous les acides. L'apparition d'une couleur rose violacée indique la neutralisation. L'acidité est exprimée en gramme d'acide malique par 100g de fruits. La valeur trouvée est multipliée par 6, correspondant au facteur de dilution.

#### II.3.3.2 Total des solides solubles (TSS)

Le taux de solides solubles dans la pulpe est mesuré à l'aide d'un réfractomètre. Une ou deux gouttes du jus de pulpe sont disposées sur le prisme de l'appareil. Le TSS est exprimé en pourcentage. La valeur lue est multipliée par 3, correspondant au facteur de dilution.

#### II.3.3.3 Dosage des chlorophylles

La détermination de la teneur en chlorophylle est réalisée selon le principe de dosage utilisé par Arnon (1949). 0,1g de pulpe broyée est resuspendue dans 20 ml d'éthanol 98° glacial pour extraire les chlorophylles. Le mélange obtenu est agité pendant 30 min puis centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 min. Ensuite, le surnageant est récupéré et l'absorbance est lue à 663 nm pour la chlorophylle a, 645 nm pour la chlorophylle b à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur en chlorophylle totale est déterminée selon la formule d'Arnon (1949) suivante:

$$\text{Chlorophylle totale (mg/g)} = (0,0202 \times D_{0645}) - (0,00802 \times D_{0663})$$

Avec,

D.O : Densité optique

### II.3.3.4 Dosage des anthocyanes

La détermination de la concentration en anthocyanes est basée selon les méthodes décrites par Iland et al. (1996, 2000) puis modifiées par l’Australian Wine Research Institute en 2006. Malvidine-3-glucoside est l’un des anthocyanes majeurs dans la pulpe de rotra (Veigas et al., 2007) et le résultat est exprimé en équivalent en malvidine .

La méthode consiste à broyer 200g de pulpe de rotra au mixeur jusqu’à obtenir une purée. Ensuite, 2g de l’homogénat sont transférés dans un tube à centrifuger de 50 ml contenant 20 ml d’éthanol à 98°. Après agitation pendant 1h, le mélange est centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 min. Puis, le surnageant est récupéré. Ensuite, 0,2 ml de surnageant est versé dans un tube avant d’ajouter 3,8 ml de 1M HCl. Le mélange obtenu est agité puis placé au réfrigérateur pendant au moins 3h (sans dépasser 24h, c’est une étape critique pour permettre l’expression de la couleur). L’absorbance de l’extrait est lue à 520nm.

### II.3.3.5 Extraction et analyse des huiles essentielles

#### ❖ Extraction de l’huile essentielle de pulpe de rotra

Pour chaque semaine, environ 500-1000g de pulpes fraîches sont soumises à une hydrodistillation pendant 4h dans un extracteur de type Clevenger modifié (Figures 11 et 12). Ici une cocotte minute et une plaque électrique remplacent le ballon et le chauffe-ballon. L’huile obtenue est, ensuite, récupérée et stockée à 5°C jusqu’à utilisation, ceci afin d’éviter toutes réactions susceptibles de modifier la composition de l’extrait.

#### ❖ Détermination du rendement en huile

Le rendement en huile essentielle est calculé par la formule suivante:

$$Rdt = \left( \frac{P_{HE}}{P_m} \right) \times 1000$$

Avec,

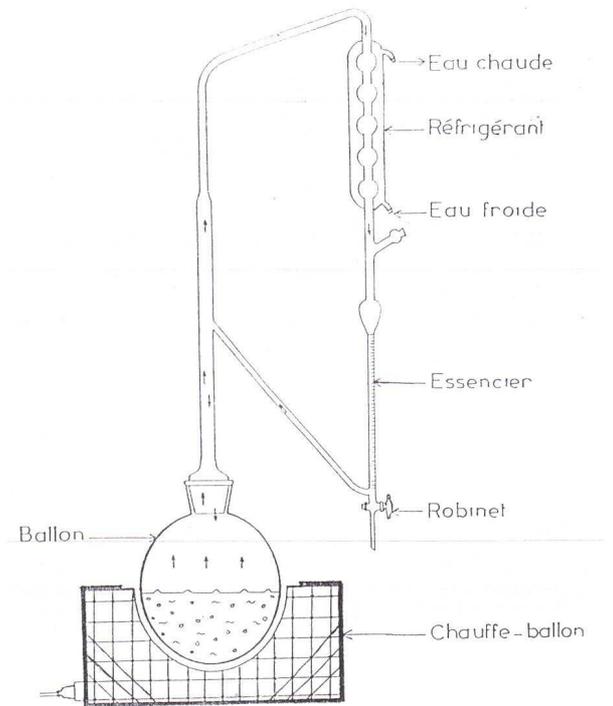
Rdt : Rendement en huile essentielle (%)

P<sub>HE</sub> : Poids huile essentielle recueilli (g)

P<sub>m</sub> : Poids frais du matériel végétal utilisé (g)



**Figure 11 :** Cocotte minute transformée en extracteur d'huile essentielle



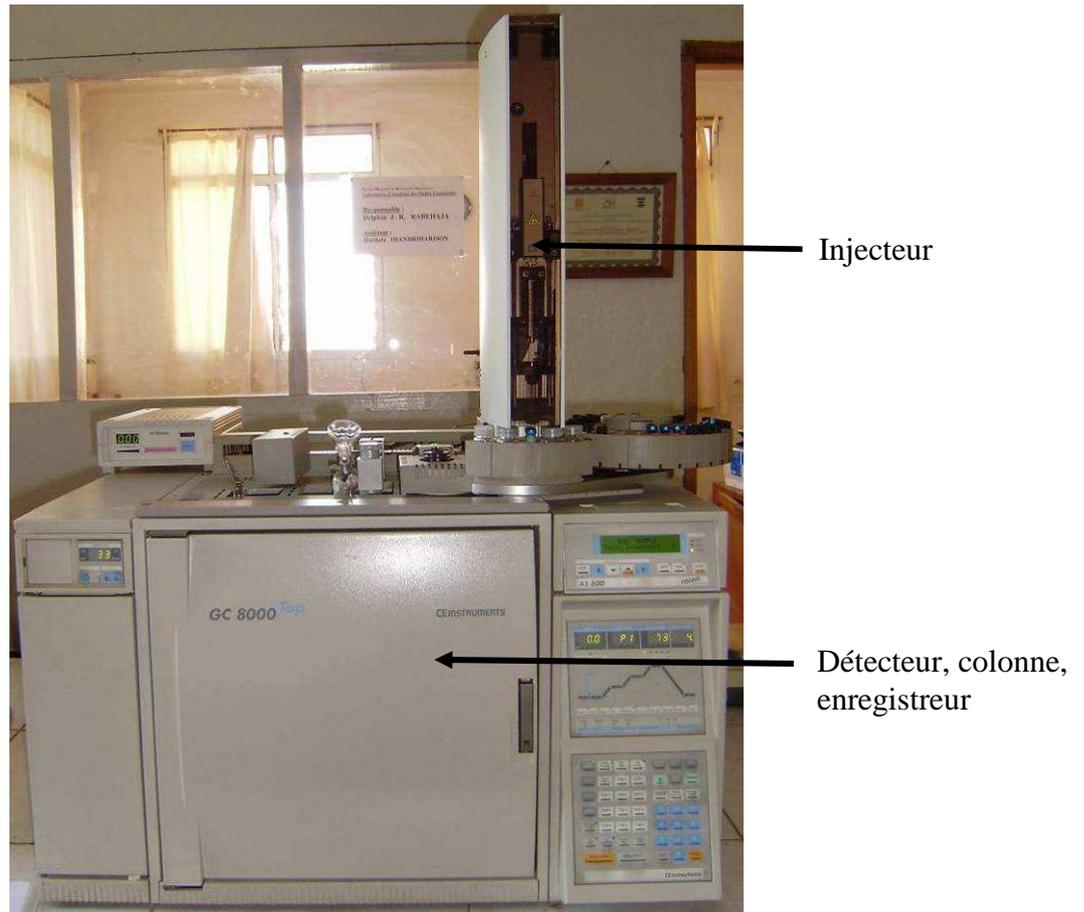
**Figure 12:** Extracteur d'huile essentielle de type Clevenger

#### ❖ Analyse de la composition chimique

Les huiles essentielles obtenues sont analysées par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG/DIF) pour déterminer les composants individuels de chaque huile ainsi que leur proportion relative (**Annexe 1**). L'identification des différents constituants se fait à partir de leurs indices de rétention dans la phase stationnaire en comparaison avec ceux des composants standards synthétiques de la banque des données informatisées du Laboratoire d'Analyse des Huiles Essentielles de l'IMRA (**Annexe 2**).

#### ❖ Présentation de l'appareil

Le chromatographe, de marque 8000 Top comprend un injecteur, une colonne, un détecteur et un enregistreur (Figure 13). L'échantillon à analyser est introduit dans la chambre d'injection. La colonne permet la séparation des produits dont les volatilités sont très différentes. Le détecteur à ionisation de flamme indique à l'opérateur la présence de solutés sortant de la colonne, par le biais d'un signal électrique. L'enregistreur transforme le signal électrique provenant du détecteur en une courbe de concentration. L'ensemble de ces courbes présente le chromatogramme.



**Figure 13:** Chromatographe de marque 8000 Top avec injecteur automatique

## II.4 Tests biologiques

### II.4.1 Principes

Pour évaluer les effets répulsifs des huiles essentielles extraites des pulpes de rotra sur les adultes de *M. signatella*, la méthode de la zone préférentielle sur papier filtre décrite par Mc Donald et al. (1970), et modifiée par d'autres chercheurs (Lale et Alaga, 2000; Obeng-ofori et Reichmuth, 1997) est utilisée.

La toxicité de l'huile essentielle vis-à-vis de *M. signatella* est évaluée par le nombre d'insectes morts après fumigation (Mukesh, 2007).

### II.4.2 Test de répulsivité

Le test consiste à découper en deux moitiés un papier filtre Whatman N°1 ( $\varnothing = 9$  cm). Différentes dilutions (1/10, 1/100 et 1/1000) de l'huile essentielle sont préparées avec de l'acétone comme solvant. A l'aide d'une micropipette, une quantité de chaque solution est uniformément répandue sur une moitié du disque, tandis que l'autre moitié reçoit uniquement de l'acétone. Après évaporation complète du solvant, les deux moitiés du disque sont

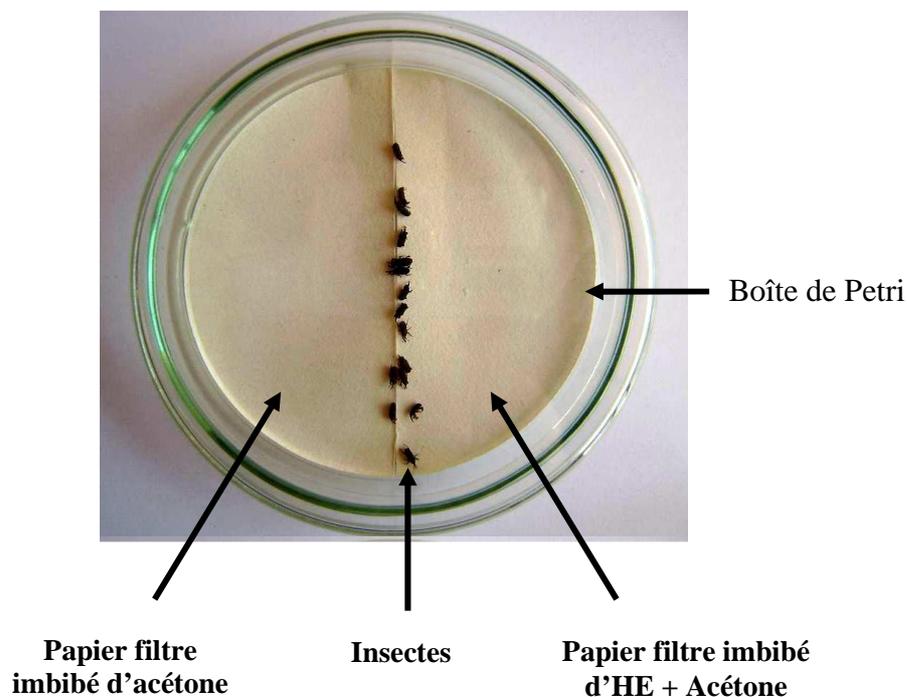
ressoudées à l'aide d'une bande adhésive et placées dans une boîte de Petri ( $\varnothing = 9$  cm). Dix adultes de *M. signatella* sont libérés au centre de chaque papier filtre et les boîtes sont fermées puis placées à l'obscurité (Figure 14). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Au bout de 4h, le nombre d'insectes présents sur la partie traitée uniquement à l'acétone (**A**) et le nombre de ceux présents sur la partie traitée à l'huile essentielle (**B**) sont enregistrés. Le pourcentage d'insectes repoussés est calculé selon la formule d'Abbot (1925) suivante:

$$\text{Pourcentage de répulsivité} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

Avec,

A = Nombre moyen d'insectes présents dans la partie non traitée (insectes repoussés)

B = Nombre moyen d'insectes présents dans la partie traitée (insectes non repoussés)



**Figure 14:** Test de répulsivité contre les adultes de *Myocalandra signatella*

La répulsivité est ensuite catégorisée selon la classification (Amin et al., 2000 ; Roy et al., 2005) suivante :

Classe 0 :  $>0,01 - 0,10$

Classe I :  $0,10 - 20,00$

Classe II :  $20,10 - 40,00$

Classe III :  $40,10 - 60,00$

Classe IV :  $60,10 - 80,00$

Classe V :  $80,10 - 100,00$

### II.4.3 Test de toxicité

L'effet toxique des huiles essentielles de rotra est testé par fumigation contre des adultes bien nourris de *M. signatella*. Dix adultes sont placés dans une boîte de Petri ( $\varnothing = 9$  cm) contenant 2g de poudre de graines de rotra. La farine a été uniformément répandue sur la surface de la boîte. Des morceaux de papier filtre (1cm<sup>2</sup>) sont imbibés avec différentes concentrations d'huile essentielle (0,5, 1, 5, 10, 20 et 40 $\mu$ l) puis apposés sur la face intérieure du couvercle de chaque boîte. Ensuite, la boîte est fermée de façon hermétique à l'aide d'une bande de caoutchouc de telle sorte que la vapeur dégagée par l'huile essentielle sature l'atmosphère. Toutes les boîtes sont placées à l'obscurité. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Après 24, 48, 72, 96 et 120h de fumigation, la mortalité des insectes a été enregistrée.

### II.4.4 Tests de spécificité

#### II.4.4.1 Test de différentes huiles essentielles

A part l'évaluation de la répulsivité de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre l'insecte *M. signatella*, sa spécificité en comparaison avec celle d'autres huiles essentielles de référence décrites comme répulsives (*Cymbopogon nardus*, *Piper nigrum*, *Pinus sp*) a été testée. Des huiles essentielles extraites de plantes courantes dont les propriétés répulsives n'ont jamais été établies sont également testées comme *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon giganteus*, *Psiadia altissima*, *Lantana camara* et *Eucalyptus globulus*.

#### II.4.4.2 Test sur *Sitophilus oryzae*

Pour évaluer l'activité répulsive de l'huile essentielle de pulpe de rotra sur d'autres insectes, son effet sur le charançon du riz (*Sitophilus oryzae*) a été testé.

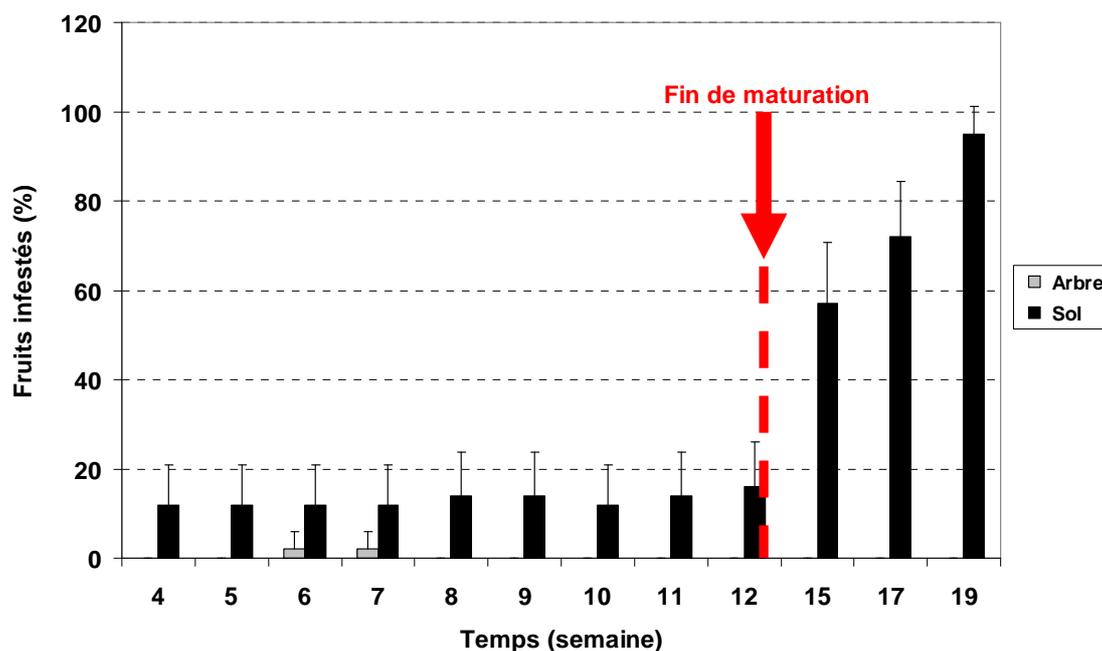
### II.4.5 Substitution

Notre étude est focalisée sur les huiles essentielles extraites de pulpes de rotra. Cependant, l'obtention de ces pulpes demande beaucoup de temps de manutention et les fruits ne sont disponibles que pendant la période de fructification de l'arbre (environ 3 mois). Donc, des solutions alternatives comme l'utilisation des feuilles de rotra en substitution des pulpes pourraient être envisagées. Les feuilles sont pérennes et peuvent être immédiatement soumises à l'hydrodistillation après la récolte tandis que les pulpes doivent être séparées de la graine. Cette substitution serait possible à condition que les extraits obtenus à partir des feuilles possèdent les mêmes propriétés répulsives que les pulpes.

# Résultats

## I Infestation des fruits au cours de la maturation

L'évolution de l'infestation des fruits de rotra au cours de la maturation est présentée sur la figure 15. Le résultat montre que le nombre de fruits infestés ramassés sur le sol varie peu au cours de la maturation. Cependant, le pourcentage d'infestation observé sur les fruits ramassés au sol (16%) est plus élevé que celui des fruits directement récoltés sur l'arbre (2%). Le suivi des fruits tombés sur le sol au-delà de la fin de la maturation révèle une forte augmentation du taux d'infestation. Sept semaines après la fin de la maturation, le pourcentage de fruits infestés atteint 95%.



**Figure 15:** Comparaison du pourcentage d'infestation des fruits au cours de la maturation, (n=50).

## II Affinité de *Myocalandra signatella* pour les fruits de rotra

*M. signatella* possède une forte affinité ( $\chi^2 = 97,52$  ;  $p < 0.001$ ) pour les fruits mûrs (85,71%) par rapport aux fruits verts (4,28%) quand ceux-ci sont préalablement séchés (Tableau 1). Quant aux résultats observés avec les fruits frais, *M. signatella* ne présente pas de préférence pour les mûrs (2,86%) et les verts (21,42%) mais reste plutôt neutre (75,71%). Les résultats obtenus avec des graines (Tableau 2) déulpées sèches montrent également une préférence très significative ( $\chi^2 = 15,33$  ;  $p < 0.001$ ) pour les graines mûres (68,57%) comparées aux graines vertes séchées (14,28%). Cependant, en présence de graines fraîches, 50% des insectes manifestent une préférence pour les mûres et 45,71% restent neutres. Seuls 4,28% sont trouvés sur les graines fraîches vertes.

**Tableau 1:** Affinité de *M. signatella* pour les fruits de rotra « mûrs » et « verts ». Les insectes qui ne se trouvent pas sur un fruit après 24 heures sont classés « neutres ».

Fruits	Affinité (%)		
	Mûr	Neutre	Vert
Secs	85,71a	10b	4,29b
Frais	2,86a	75,71b	21,43c

Pour chaque ligne, les pourcentages suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents après un test du Khi2

**Tableau 2:** Affinité de *M. signatella* pour les graines de rotra « mûrs » et « verts ». Les insectes qui ne se trouvent pas sur un fruit (ou graine) après 24 heures sont classés « neutres ».

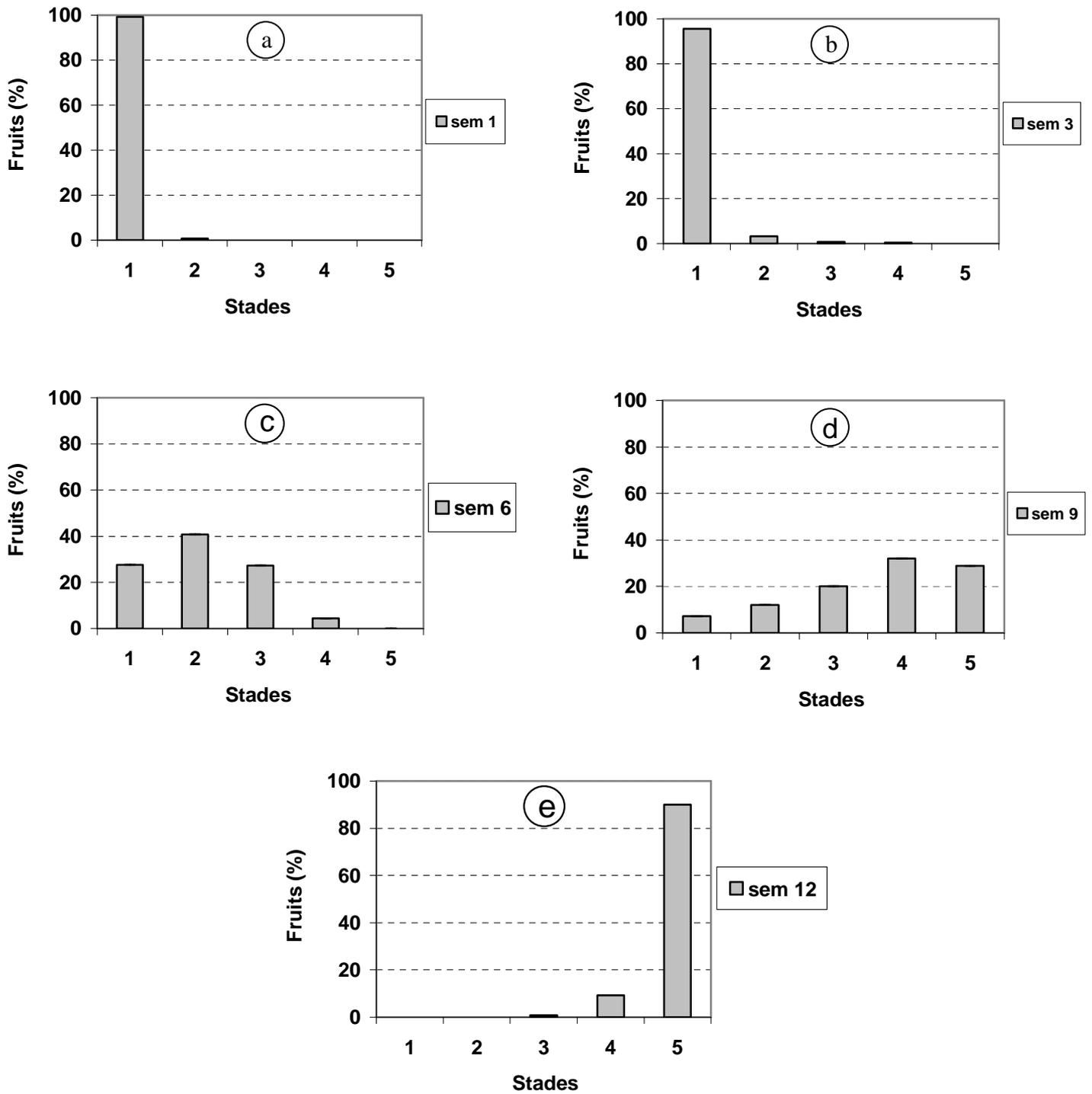
Graines	Affinité (%)		
	Mûr	Neutre	Vert
Sèches	68,57a	17,14b	14,29b
Fraîches	50a	45,71a	4,29b

Pour chaque ligne, les pourcentages suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents après un test du Khi2

### III Caractéristiques morphométriques des fruits de rotra

#### III.1 Proportions relatives des différents stades de maturation

En tenant compte de la classification des fruits de rotra en fonction de leur coloration, il apparaît que les proportions relatives des cinq stades varient au cours des 12 semaines de maturation (Figure 16). Le pourcentage de stade 1 atteint un maximum de 99,2% pendant les trois premières semaines de récolte (Figure 15a et b) avant de chuter à 2%, vers la fin de la maturation. Contrairement, les fruits de stade 5 sont absents en début de récolte puis deviennent prépondérants (90%) en fin de récolte (Figure 15e). Les stades intermédiaires 2, 3 et 4 dominent entre les semaines 6 et 9 (Figure 15c et d).



**Figure 16 (a-e):** Variation de la proportion relative des différents stades de maturation des fruits de rotra au cours des semaines 1(a), 3(b), 6(c), 9(d) et 12(e), (n=250).

### III.2 Poids

Durant la maturation des fruits de rotra, nous constatons que leur poids augmente progressivement de 0,29 à 3,61g (Figure 17). Le résultat montre que le poids des fruits croît rapidement de la première à la septième semaine, puis reste plus ou moins stable jusqu'à la fin de la maturation.

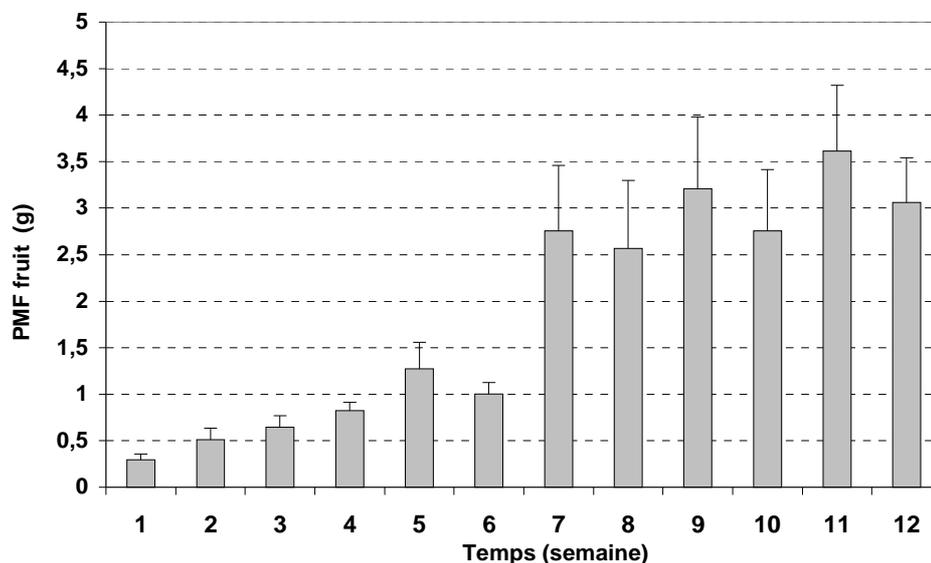


Figure 17: Variation du poids frais (PMF) du fruit de rotra au cours de la maturation. Barre =  $IC_{\alpha=5\%}$ .

### III.3 Longueur et diamètre

La longueur et le diamètre des fruits augmentent progressivement jusqu'à la septième semaine de maturation. La longueur varie de 1,38 à 2,55cm. Quant au diamètre des fruits, les moyennes calculées fluctuent entre 0,44 et 1,35cm (Figure 18).

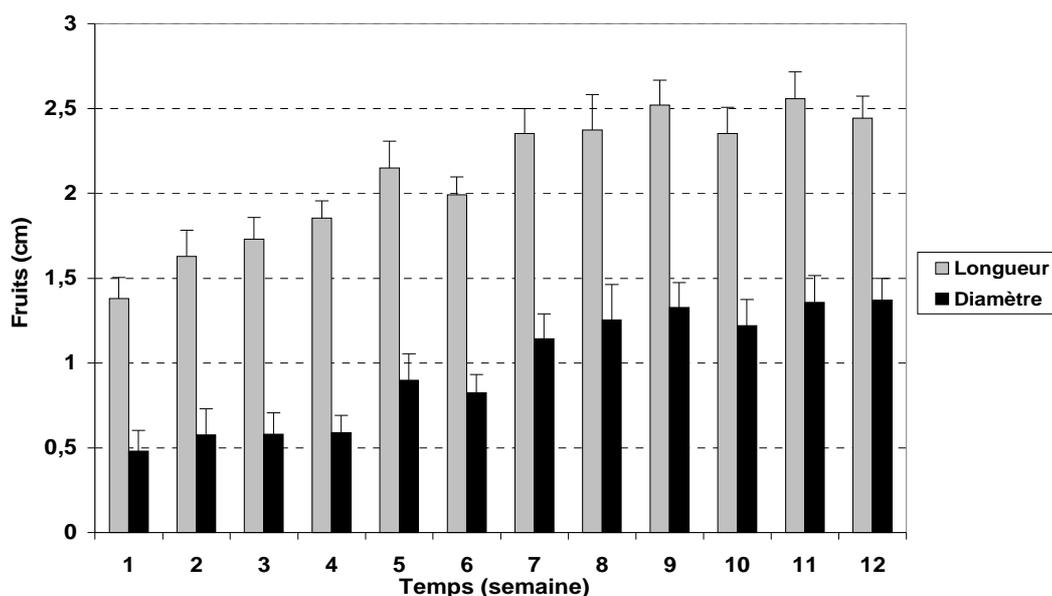


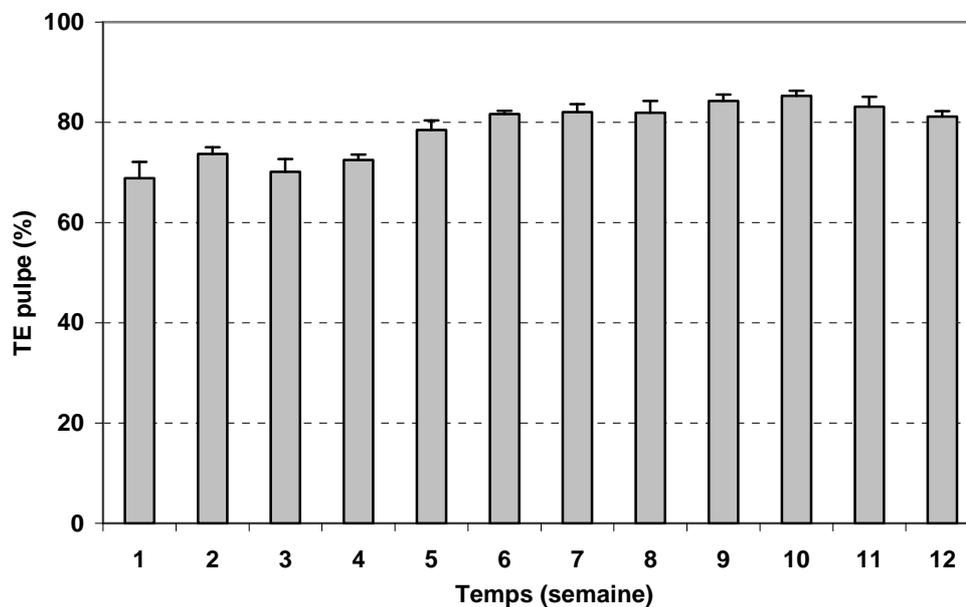
Figure 18: Evolution de la longueur et du diamètre des fruits de rotra au cours de la maturation.

Barre =  $IC_{\alpha=5\%}$ .

## IV Caractérisation physico-chimiques de la pulpe de rotra

### IV.1 Teneur en eau (TE)

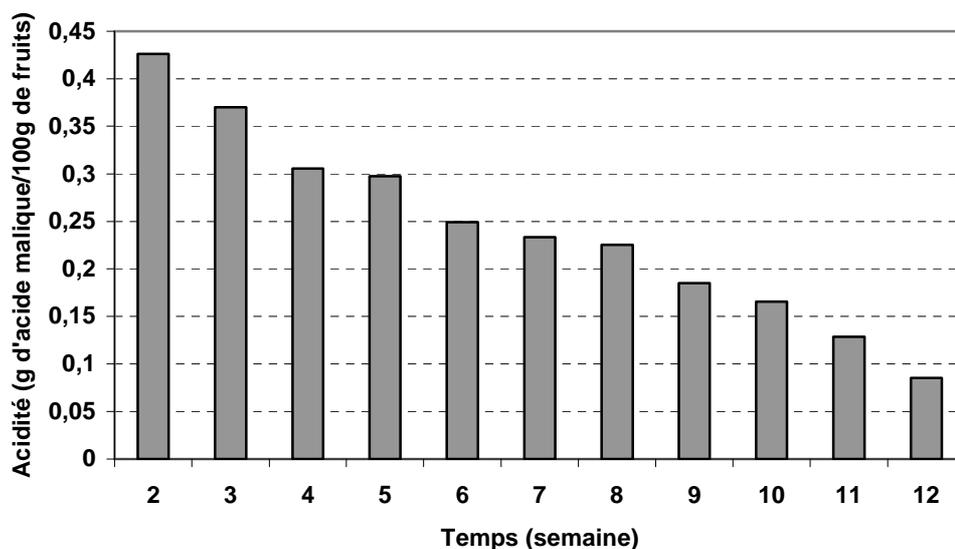
La teneur en eau augmente de 68,8 à 83,11%, du début jusqu'à la septième semaine de maturation. Au-delà de cette période, la teneur en eau observée reste stable (Figure 19).



**Figure 19:** Variation de la teneur en eau (TE) de la pulpe de rotra au cours de la maturation. Barre =  $IC_{\alpha=5\%}$ .

### IV.2 Acidité titrable

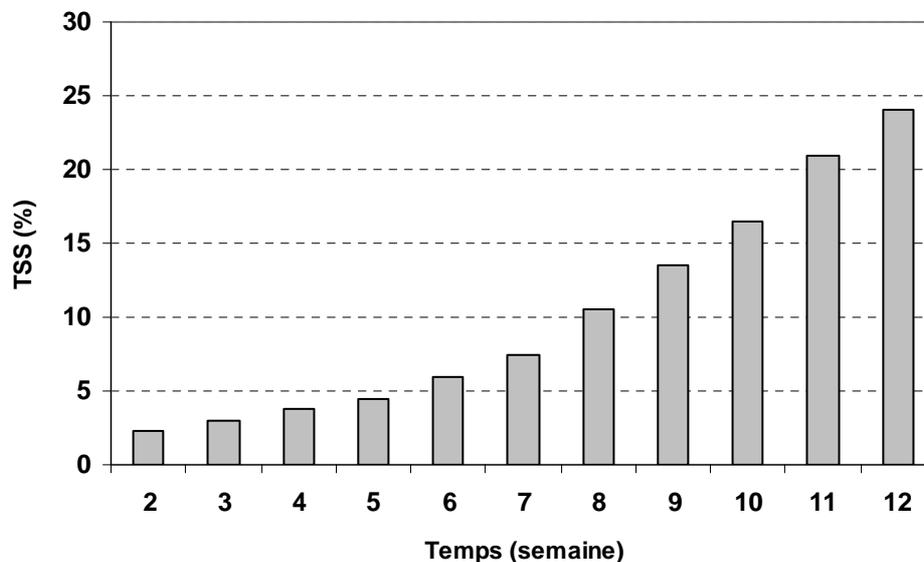
L'acidité de la pulpe diminue progressivement de 0,42 à 0,08 g d'acide malique /100g de fruits au cours de la maturation (Figure 20).



**Figure 20:** Variation de l'acidité de la pulpe de rotra au cours de la maturation des fruits.

### IV.3 Total de solides solubles (TSS%)

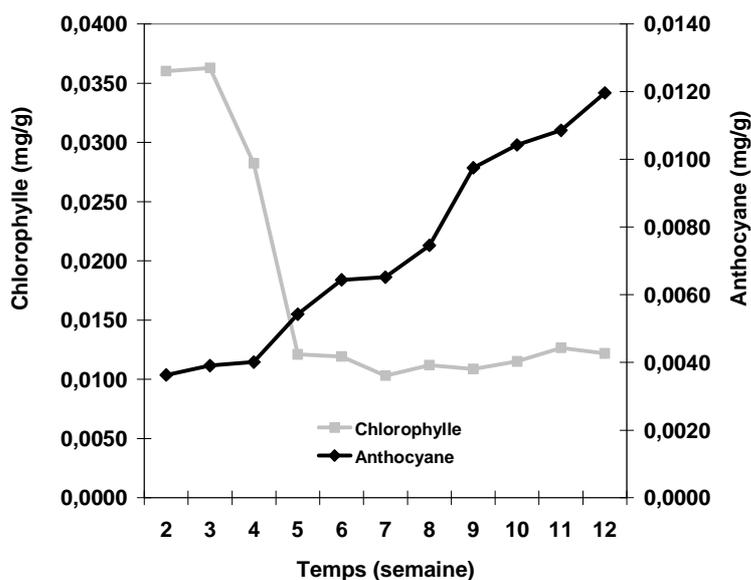
Le TSS augmente progressivement de 2,25 à 24% à la fin de la maturation des fruits de rotra (Figure 21).



**Figure 21:** Variation du total de solides solubles (TSS) de la pulpe de rotra au cours de la maturation des fruits.

### IV.4 Teneurs en chlorophylles et en anthocyanes totaux

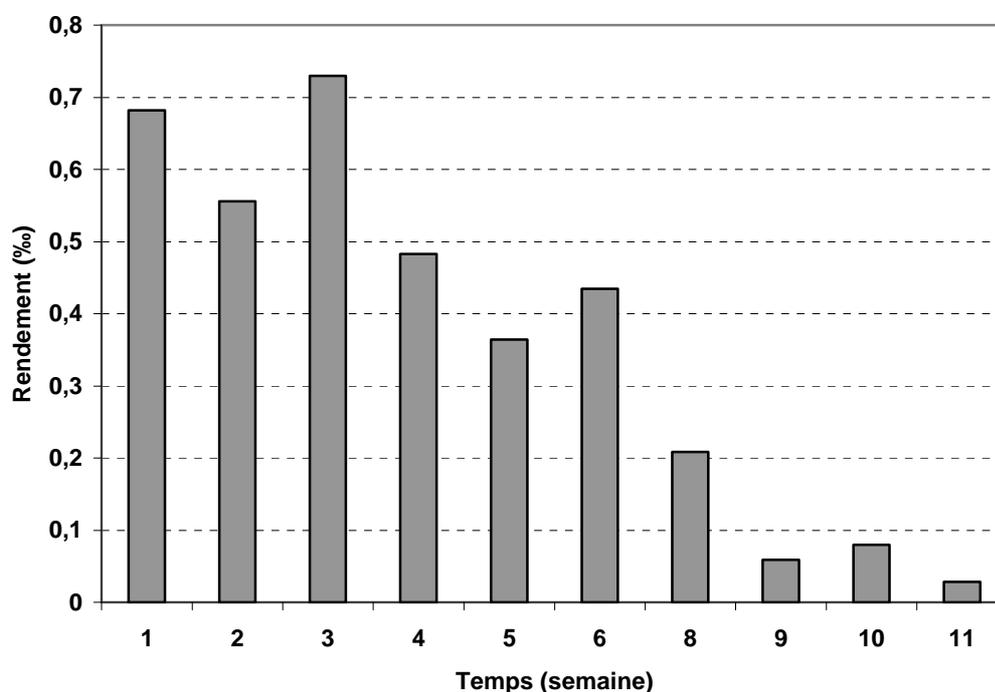
Les résultats du dosage des chlorophylles et anthocyanes totaux contenus dans la pulpe de rotra sont présentés sur la figure 22. La teneur en chlorophylles diminue brutalement de 0,0363 à 0,0121 mg/g entre les semaines 3 et 5 puis reste invariable jusqu'à la fin de la maturation. Par contre, la concentration en anthocyanes augmente progressivement de 0,003 à 0,012 mg/g de la quatrième semaine jusqu'à la fin de la maturation.



**Figure 22:** Variation des teneurs en chlorophylles et en anthocyanes totaux de la pulpe de rotra au cours de la maturation.

#### IV.5 Rendement en huile essentielle

En général, le rendement décroît de 0,70 à 0,02%, de la troisième semaine jusqu'à la fin de la maturation (Figure 23). En effet, le rendement reste relativement stable avant la troisième semaine.



**Figure 23:** Variation du rendement en huile essentielle de pulpe de rotra au cours de la maturation.

#### IV.6 Variation qualitative de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra

L'évolution de la composition de l'huile essentielle de pulpe de rotra au cours de la maturation est représentée dans le tableau 3. Le taux de monoterpènes augmente fortement entre la semaine 1 (0,99%) et 3 (90,13%) puis se stabilise avant de chuter en fin de maturation (2,31%). Les constituants majeurs des monoterpènes sont le *cis*- $\beta$ -ocimène, le *trans*- $\beta$ -ocimène, l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -myrcène. Par contre, le taux de sesquiterpènes est élevé (43,02%) en début de maturation puis décroît fortement dès la troisième semaine (3,03%) avant de remonter sensiblement en fin de maturation (29,32%). Ces fluctuations du taux en sesquiterpènes proviennent principalement de germacrène-D,  $\beta$ -cadinène,  $\delta$ -cadinène, caryophyllène oxyde,  $\beta$ -caryophyllène et  $\alpha$ -humulène. Le taux de produits oxygénés décroît brutalement entre la semaine 1 (36,08%) et la semaine 3 (0,08%) puis remonte légèrement à la douzième semaine (5,51%). Les composants majeurs des produits oxygénés sont le linalool, l'acétate de géranyl, le benzoate de benzyl et l'eugénol. De même, le taux de composés non identifiés diminue entre la semaine 1 (19,9%) et la semaine 3 (5,91%) puis se stabilise avant d'augmenter considérablement en fin de maturation (62,85%).

**Tableau 3:** Variation des teneurs relatives des constituants chimiques de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra au cours de la maturation.

	Constituants	Semaine				
		1	3	6	8	12
MONOTERPENES	<b>α-pinène</b>	<b>0,338</b>	<b>18,105</b>	<b>14,458</b>	<b>11,107</b>	-
	β-pinène	0,170	0,811	0,645	0,476	-
	<b>β-myrcène</b>	<b>0,180</b>	<b>3,959</b>	<b>3,927</b>	<b>3,917</b>	-
	α-terpinène	-	0,050	-	-	-
	Limonène	0,042	0,538	0,462	0,691	0,204
	β-phellandrène	0,214	-	-	-	-
	<b>cis-β-ocimène</b>	-	<b>45,384</b>	<b>48,451</b>	<b>46,665</b>	<b>1,508</b>
	γ-terpinène	-	0,154	0,133	0,137	-
	<b>trans-β-ocimène</b>	-	<b>20,579</b>	<b>20,701</b>	<b>19,262</b>	0,600
	p-cymène	-	0,030	-	0,096	-
	Terpinolène	-	0,525	0,483	0,61	-
	α-cubébène	0,042	-	-	-	-
	Camphène	-	-	-	0,062	-
	<b>Total</b>	<b>0,986</b>	<b>90,135</b>	<b>89,260</b>	<b>83,023</b>	<b>2,312</b>
SESQUITERPENES	δ-élémane	0,060	0,049	-	0,054	-
	<b>β-caryophyllène</b>	<b>1,318</b>	<b>1,509</b>	<b>2,051</b>	<b>2,284</b>	<b>6,768</b>
	α-humulène	2,130	0,919	0,164	0,216	0,685
	β-sélinène	0,050	0,076	0,129	0,182	-
	α-muuroène	0,057	0,050	-	-	1,102
	γ-cadinène	0,127	0,050	0,089	0,05	0,833
	<b>β-cadinène</b>	<b>10,257</b>	<b>0,080</b>	<b>0,169</b>	<b>0,132</b>	<b>0,272</b>
	<b>δ-cadinène</b>	<b>9,899</b>	<b>0,042</b>	<b>0,056</b>	<b>0,084</b>	-
	α-copaène	-	0,056	0,047	0,078	0,148
	<b>Caryophyllène oxyde</b>	-	<b>0,162</b>	<b>0,184</b>	<b>0,601</b>	<b>5,110</b>
	Aromadendrène	-	-	-	-	-
	<b>Germacrène-D</b>	<b>19,122</b>	0,044	0,154	<b>3,227</b>	<b>14,404</b>
	<b>Total</b>	<b>43,020</b>	<b>3,037</b>	<b>3,043</b>	<b>6,908</b>	<b>29,322</b>
PRODUITS OXYGENES	1,8-cinéol	0,034	0,034	-	0,554	0,457
	α-terpinéol	0,144	-	-	-	-
	<b>Linalool</b>	<b>24,328</b>	-	-	-	<b>0,385</b>
	Eugéno	0,085	-	0,132	0,103	<b>2,895</b>
	Nérol	-	0,049	-	0,218	1,414
	Acétate de géranyle	<b>8,997</b>	-	-	-	-
	Benzoate de benzyle	<b>2,495</b>	-	-	-	-
	Acétate de bornyle	-	-	-	0,093	0,361
	<b>Total</b>	<b>36,083</b>	<b>0,083</b>	<b>0,132</b>	<b>0,968</b>	<b>5,512</b>
NON IDENTIFIES*	<b>Total</b>	<b>19,904</b>	<b>5,917</b>	<b>7,234</b>	8,87	<b>62,854</b>
<b>Totaux</b>	<b>99,977</b>	<b>99,172</b>	<b>99,669</b>	<b>99,986</b>	<b>100</b>	

\*La liste des composés non identifiés est présentée en annexe 3.

## V. Résultats des tests biologiques

### V.1 Effet répulsif de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra contre *M. signatella*

Au cours de la maturation, l'interaction entre la dilution et le temps de maturation agit de façon significative ( $P=0,002$  ; Tableau 4) sur la répulsivité de l'huile contre *M. signatella* (Tableau 5). Le pourcentage de répulsivité diminue en fonction de la dilution et varie au cours de la semaine de maturation. L'activité répulsive est élevée à la dilution 1/10 et ceci est valable pour chaque semaine de maturation (57,16 à 84,39%) après 4h d'exposition. L'huile essentielle extraite à la troisième semaine possède le maximum de répulsivité. Cependant, cette activité devient faible aux plus fortes dilutions (1/100 et 1/1000). Le pourcentage de répulsivité varie de 29,89 à 69,03% et -63,52 à 35,11%, respectivement, à l'exception de l'huile essentielle extraite à la huitième semaine qui possède encore un taux de répulsivité de 69,03%.

**Tableau 4:** Résultats de l'analyse des variances de l'effet de la dilution et de la période de récolte des fruits sur la répulsivité de l'huile essentielle de pulpe de rotra

Source des variations	v.r	P
Dilution	43,14	<0,001
Temps	4,91	0,004
Dilution x Temps	3,98	0,002

**Tableau 5:** Pourcentage de répulsivité de l'huile essentielle de pulpe de rotra extraite à différents temps de la maturation contre *Myocalandra signatella*.

Dilution	Temps (semaine)			
	1	3	6	8
1/10	57,16 <sub>a</sub> <sup>a</sup>	84,39 <sub>a</sub> <sup>a</sup>	62,41 <sub>a</sub> <sup>a</sup>	78,89 <sub>a</sub> <sup>a</sup>
1/100	43,34 <sub>a</sub> <sup>ab</sup>	35,1 <sub>b</sub> <sup>ab</sup>	29,89 <sub>b</sub> <sup>a</sup>	69,03 <sub>a</sub> <sup>b</sup>
1/1000	35,11 <sub>a</sub> <sup>a</sup>	-1,2 <sub>b</sub> <sup>ab</sup>	-63,52 <sub>c</sub> <sup>c</sup>	-20,33 <sub>b</sub> <sup>b</sup>

LSD<sub>0,05</sub>=36,50

Pour les facteurs « dilution » et « temps », les moyennes suivies de la même lettre en indice et en exposant, respectivement, ne sont pas significativement différentes ( $\alpha=0,05$ ).

### V.2 Effet toxique de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra contre *M. signatella*

Les résultats du test de toxicité de l'huile essentielle de pulpe de rotra sur *M. signatella* sont exprimés dans le tableau 6. Le taux de mortalité de *M. signatella* observé en fonction du temps d'exposition et des différentes concentrations montre un effet non toxique. L'effet toxique n'est observé qu'après 4 et 5 jours (10 et 16,6%) et ceci avec une dose élevée d'huile essentielle de 40 $\mu$ l/100 ml.

**Tableau 6:** Mortalité de *M. signatella* exposés pendant différents temps à l'huile essentielle de pulpe de rotra (n = 30).

Concentration ( $\mu$ l/)	Mortalité (%)				
	24h	48h	72h	96h	120h
0,5	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	6	0
40	0	0	0	10	16,6

### V.3 Effet répulsif d'autres huiles essentielles contre *M. signatella*

Les résultats des tests de répulsivité d'autres huiles essentielles en comparaison avec celle extraite de la pulpe de rotra en début de maturation sont représentés dans le tableau 7. Toutes les huiles testées possèdent un effet répulsif contre *M. signatella* mais leur pourcentage de répulsivité varie sensiblement. L'huile essentielle extraite de pulpe de rotra présente une répulsivité élevée (84,39%) comparable à celle de clous de girofle (*Syzygium aromaticum*). Les huiles essentielles de citronnelle (*Cymbopogon nardus*), de feuilles fraîches de rotra (*Syzygium cumini*), d'aiguilles de pins (*Pinus sp*) et de poivre noir (*Piper nigrum*) ont également des propriétés répulsives élevées avec 79,17, 78,93, 75,18 et 75,03%, respectivement. Quant aux huiles de *Cymbopogon giganteus*, *Eucalyptus globulus* et de *Lantana camara*, leur pourcentage de répulsivité est faible avec 44,37%, 44,74% et 59,51%. Ainsi, elles appartiennent à la classe III.

**Tableau 7:** Pourcentages de répulsivité de différentes huiles essentielles contre *Myocalandra signatella*.

Espèces	Noms vernaculaires	Répuisivité	Classe <sup>1</sup>
<i>Syzygium cumini</i> (pulpe)	Rotra	84,39a	V
<i>Syzygium aromaticum</i> (clous)	Jirofo	82,49a	V
<i>Cymbopogon nardus</i> (feuilles)	Veromanitra	79,17a	IV
<i>Syzygium cumini</i> (feuilles)	Rotra	78,93a	IV
<i>Pinus sp</i> (aiguilles)	Kesika	75,18a	IV
<i>Piper nigrum</i> « noir » (fruits)	Dipoavatra	75,03a	IV
<i>Psiadia altissima</i> (feuilles)	Dingadingana	66,55ba	IV
<i>Piper nigrum</i> « vert » (fruits)	Dipoavatra	66,37ba	IV
<i>Lantana camara</i> (feuilles)	Radriaka	59,51ba	III
<i>Eucalyptus globulus</i> (feuilles)	Kininina	44,74c	III
<i>Cymbopogon giganteus</i> (feuilles)	Ahibero	44,37c	III

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $\alpha=0,05$ ).

<sup>1</sup>Classe de répulsivité (Amin et al.,2000)

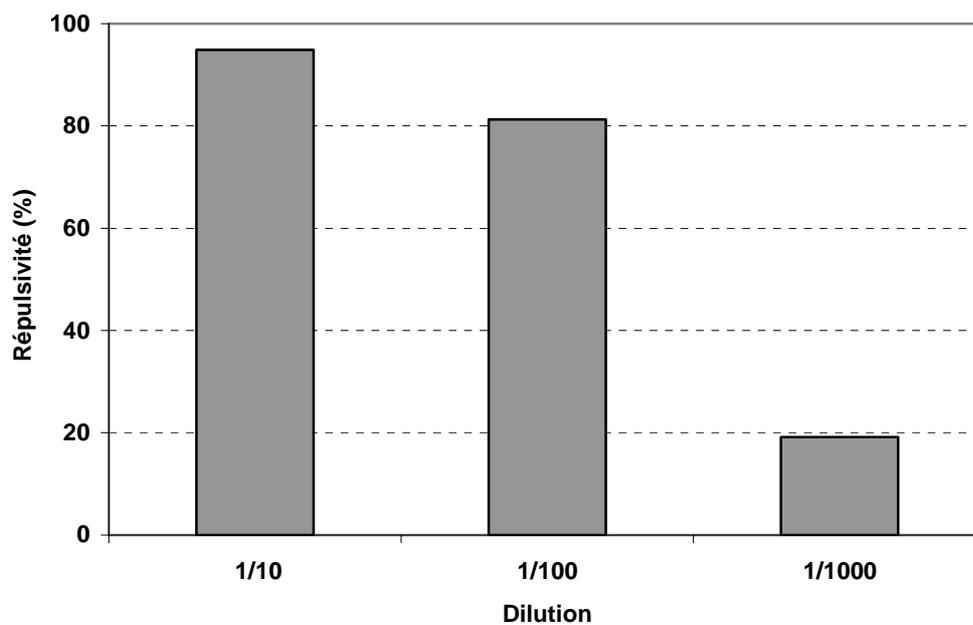
Classe III : 40,1 - 60%

Classe IV : 60,1 - 80%

Classe V : 80,1 - 100%

#### V.4 Effet répulsif de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre *Sitophilus oryzae*

L'huile essentielle de pulpe de rotra, obtenue pendant la troisième semaine de maturation est répulsive contre le charançon du riz *Sitophilus oryzae* (Figure 24). Cet effet est dose dépendant car le pourcentage de répulsivité diminue en fonction de la dilution.



**Figure 24:** Effet de la dilution sur la répulsivité de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre *Sitophilus oryzae*

# Discussions

### ❖ **Physiologie de la maturation des fruits de rotra**

Au cours des sept premières semaines de maturation, les fruits de rotra présentent une augmentation rapide du poids frais, de la longueur et du diamètre des fruits. Après cette phase, la croissance diminue et devient nulle jusqu'à la fin de la maturation. Ainsi, deux phases sont observées au cours des douze semaines de croissance du fruit. Cependant, la cinétique de la croissance des fruits est caractérisée, généralement, par une évolution du poids et du volume suivant une courbe à double sigmoïde qui s'effectue en trois phases de croissance. C'est le cas pour le raisin (Coombe, 1992), l'olive, l'abricot, la pêche et la cerise (Gérard, 1978). Cette dissemblance concernant l'allure des courbes de croissance du rotra par rapport aux autres fruits viendrait du commencement de la récolte des fruits de rotra dans le cadre de ce travail. En effet, la première semaine correspond à la période au cours de laquelle plus de 95% des fruits contiennent un endosperme solide. Or, à ce stade, le fruit de rotra a déjà acquis une certaine taille.

Durant les premières semaines de croissance, le fruit change de couleur et passe du vert au jaune. En effet, le stade 2 devient prépondérant au cours des semaines 5 et 6. Cette acquisition d'une nouvelle coloration au niveau de la pulpe coïncide avec une dégradation rapide des chlorophylles entre les semaines 4 et 6. Ce changement implique la transformation des chloroplastes en chromoplastes mais aussi la dégradation des chlorophylles par la chlorophyllase sous le contrôle de l'éthylène (Trebitch et al., 1993 ; Guis et al., 1997). La couleur jaune proviendrait du pool de caroténoïdes déjà présents au niveau de la pulpe mais qui sont devenus apparents après la disparition d'une partie des chlorophylles (Gérard, 1978). La néosynthèse de pigments colorés (caroténoïdes, anthocyanes) est également responsable du changement de couleur (Minguez et al., 1994). A partir de la 7<sup>ème</sup> semaine, la pulpe présente des taches violacées indicateurs de la véraison (stade 3 et 4) puis devient noir pourpre vers la 12<sup>ème</sup> semaine (stade 5). Le déroulement de la phase de maturation chez le rotra est comparable à celle rapportée chez l'olive chez qui les 5 stades de maturation ont été identifiés (Uceda et al, 1998). La véraison correspond au démarrage de la maturation (Deloire, 2008). La synthèse des anthocyanes est une des premières manifestations suivant le déclenchement de la véraison. Les anthocyanes sont responsables de la coloration rouge, pourpre et bleue des fruits tels que les myrtilles, mûres, raisins noir, aubergines, prunes et fraises. D'après Jungmin et al. (2008), le pelargonidine, le cyanidine, le peonidine, le delphinidine, le petunidine et le malvidine sont les six anthocyanidines courants trouvés dans la nature. Cependant, les fruits de rotra doivent sa couleur pourpre aux trois pigments anthocyaniques delphinidine,

petunidine et malvidine. Le malvidine constitue l'anthocyane majeur en fin de maturation (Veigas et al., 2008).

Ce stade de véraison est aussi caractérisé par un ramollissement du fruit, plus précisément une perte de fermeté, et ceci s'accompagne par une entrée active de sucres (Deloire, 2008). Chez le rotra, le TSS augmente fortement à partir de la 7<sup>ème</sup> semaine et atteint un maximum à la fin de la maturation. L'augmentation du TSS est causée par la conversion rapide des polysaccharides en sucres simples et de leur accumulation dans les vacuoles de la pulpe. En effet, au stade vert, les sucres sont métabolisés et assurent la croissance de la graine. Contrairement, l'acidité titrable diminue jusqu'à ce que la maturation s'achève. Cette diminution de l'acidité de la pulpe est expliquée par l'hydrolyse accrue des acides organiques. Chez certains fruits comme *Vaccinium macrocarpon*, l'acidité totale augmente significativement au cours de la maturation grâce à une importante contribution de l'acide citrique (Çelik et al., 2008).

#### ❖ **Variation du rendement en huile essentielle de pulpe de rotra au cours de la maturation**

Au cours de la maturation, le rendement en huile essentielle de pulpe de rotra atteint un maximum à la 3<sup>ème</sup> semaine avec 0,7‰, puis décroît fortement jusqu'à la fin de la maturation avec 0,02‰. Ces résultats sont similaires à ceux décrits par Jerkovic et al., (2002) et Wissem et al. (2008) chez le fruit de myrtes (*Myrtus communis*), qui montrent une augmentation du rendement en huile essentielle au cours des premières semaines de croissance avant une forte diminution au 180<sup>ème</sup> jour après la floraison. Flamini et al. (2004) ont également trouvé que le rendement en huile essentielle des fruits de *Pistacia palaestina* décroît de 0,16 à 0,06% dans les fruits non mûrs et mûrs, respectivement. Dans le cas du rotra, cette diminution du rendement suggère une relation étroite avec celle de la teneur en chlorophylles et l'augmentation de la teneur en anthocyanes.

#### ❖ **Activité répulsive de l'huile essentielle de pulpe de rotra contre *M. signatella***

L'analyse par GC-FID révèle 33 composés identifiés dont les teneurs relatives varient au cours de la maturation. La proportion relative des monoterpènes pendant la troisième, sixième et huitième semaine (90,13 ; 89,26 et 83,02%) est la plus élevée. Leurs composés majeurs sont le cis- $\beta$ -ocimène, le trans- $\beta$ -ocimène, l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -myrcène. Ce résultat corrobore celui de Vijayanand et al. (2001) qui rapporte la présence de 29 composés dans l'huile

essentielle extraite de pulpe de rotra mûrs. Ces auteurs confirment l'abondance des monoterpènes et de leurs produits oxygénés qui constituent 79,14% de l'huile essentielle. Quant aux sesquiterpènes et leurs produits oxygénés, ils représentent la fraction mineure avec une teneur relative de 17,67%. Cependant, dans la présente étude, les sesquiterpènes, représentés par le germacrène-D,  $\beta$ -cadinène,  $\delta$ -cadinène, caryophyllène oxyde,  $\beta$ -caryophyllène et  $\alpha$ -humulène, se distinguent pendant la première (43,02%) et la dernière semaine (29,32%) de maturation. Or, les monoterpènes ont des activités insecticides et répulsives contre les insectes des denrées stockées (McCarron et al., 1995 ; Tsao et al., 1995 ; Obeng-Ofori et al., 1997 ; Tripathi et al., 2001). Les résultats obtenus au cours de cette étude confirment ces observations. En effet, l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra montre une forte activité répulsive contre *M. signatella* au cours des semaines 3, 6 et 8. Hassanali et al. (1990) rapporte également un effet répulsif des huiles essentielles de feuille d'*Ocimum suave* et des clous de girofle contre les insectes du genre *Sitophilus zeamais*. Cependant, l'eugénol, qui est un produit oxygéné des monoterpènes, constitue la majorité de l'huile de clous de girofle mais reste un produit mineur dans l'huile essentielle de pulpe de rotra. En effet, la teneur en eugénol atteint un taux maximal de 3% en fin de maturation.

#### ❖ **Activité répulsive des huiles essentielles de substitution contre *M. signatella***

En outre, d'autres huiles essentielles pourraient être utilisées comme substituant car la pulpe de rotra n'est pas disponible pendant toute l'année. Comme décrit précédemment, l'huile extraite des clous de girofle, espèce appartenant à la même famille que le rotra, contient 76,39% d'eugénol et est fortement répulsive (classe V) contre *M. signatella*. Les feuilles de rotra contiennent également une faible teneur en eugénol (0,07%). Néanmoins, les huiles essentielles de feuilles de rotra, des aiguilles du pin, des fruits du poivre et des feuilles de dingadingana (classe IV) exhibent un potentiel répulsif comparable à l'huile de pulpe (classe V) grâce à l'abondance de composés monoterpéniques. L'huile de feuille de rotra est composée par l' $\alpha$ -pinène (40,52%), cis- $\beta$ -ocimène (22,45%) et le trans- $\beta$ -ocimène (10,90%). Pour les aiguilles du pin (classe IV), sa composition chimique est constituée en majeure partie par l' $\alpha$ -pinène (62,82%), limonène (14,16%) et le  $\beta$ -pinène (11,77%). Celle des fruits du poivre noir (classe IV) est composée par le limonène (20,98%),  $\beta$ -pinène (17,35%),  $\delta$ -3-carène (18,76%) et le  $\beta$ -caryophyllène (13,47%). Pour les fruits du poivre vert, l'huile est majoritairement composée par l' $\alpha$ -pinène (32,10%), limonène (16,98%),  $\beta$ -pinène (15,84%) et le  $\delta$ -3-carène (15,29%). La composition chimique majeure des feuilles de dingadingana (classe IV) est constituée par le  $\beta$ -pinène (42,16%),  $\beta$ -myrcène (6,98%) et le 1,8-cinéole

(5,03%). Quant à l'huile de feuilles de citronnelle, son activité répulsive (classe IV) proviendrait du géraniol (37,16%), néral (28,64%) et du  $\beta$ -myrcène (18,73%). Le géraniol et le néral sont des aldéhydes et cette classe chimique pourrait également avoir des propriétés répulsives contre les insectes des stocks (Lwande et al, 1992). Toutefois, les huiles de feuilles de *Lantana camara*, d'*Eucalyptus globulus* et de *Cymbopogon giganteus* sont nettement moins répulsive (classe III). En plus des monoterpènes, ces huiles sont également composées par des cétones (davanone : 22,82%) et plusieurs produits oxygénés (1,8-cinéole : 76,34% ; trans-p-mentha-2,8-dienol : 15,07% ; trans-p-mentha-1(7)8-dien-2-ol : 13,55% et de cis-p-mentha-1(7)8-dien-2-ol (11,97%). Dans ce cas, ce serait probablement les constituants mineurs qui sont responsables de l'activité répulsive.

#### ❖ Toxicité de l'huile essentielle de pulpe de rotra

L'huile de pulpe obtenue au cours de la 3<sup>ème</sup> semaine de maturation présente la plus forte potentielle de répulsion contre *M. signatella*. Néanmoins, sa toxicité vis-à-vis de cet insecte reste très réduite, probablement à cause de sa faible teneur relative en  $\alpha$ -pinène (18,1%). En effet, les travaux effectués par Leon et al., (2003) a montré une forte toxicité de l'huile essentielle d'*Eucalyptus saligna* contre un Bruchidae (*Callosobruchus maculatus*) grâce à sa teneur élevée en  $\alpha$ -pinène (40%). Ainsi, les effets répulsifs et insecticides de ces huiles dépendraient de plusieurs facteurs, entre autres leur composition chimique et le niveau de sensibilité de l'insecte (Casida, 1990).

#### ❖ Effet dose-dépendant de l'huile essentielle de pulpe de rotra

Dans notre étude, *M. signatella* est plus sensible à la dilution la plus faible de l'huile de pulpe de rotra et ceci est valable pour chaque semaine de maturation. En effet, quand l'huile est diluée 10 fois, le pourcentage de répulsivité est très élevé (57,16 à 84,39%) alors qu'avec une dilution à 100 fois, le pourcentage décroît (29,89 à 69,03%) et ceci devient très faible (35,11 à -63,52%) quand elle est diluée 1000 fois. Par conséquent, la sensibilité de l'insecte dépend de la dose d'huile essentielle appliquée. Plus l'huile essentielle est diluée, plus l'activité répulsive diminue. Ces résultats confirment ceux obtenus avec de l'huile essentielle de feuille de *Xylopiya aetiopica* contre *Sitophilus zeamais* qui montrent une augmentation importante de la répulsivité en fonction de la dose appliquée (Assawalam et al., 2006).

Nous avons montré que cette activité répulsive de l'huile essentielle de pulpe de rotra n'est pas spécifique de *M. signatella*. En effet, elle repousse aussi les charançons du riz, *Sitophilus oryzae* (94,88%) démontrant par cela un plus large spectre d'action. Des travaux effectués par

Obeng-Ofori et al. (1997) avec l'huile essentielle d'*Ocimum suave* montrent un effet répulsif contre les insectes du genre *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* et *Tribolium castaneum*.

#### ❖ Infestation des fruits de rotra en fonction de leur origine

Dans cette étude, les fruits de rotra ramassés sur le sol au cours des douze semaines de maturation présentent un taux d'infestation plus élevée (16%) comparés aux fruits récoltés directement sur l'arbre (2%). Quand tous les fruits sont tombés au sol, après la fin de la maturation, 95% des fruits collectés sont infestés. En effet, les fruits mûrs se dégradent rapidement et pourrissent, donc facilement attaquables par les insectes qui se trouvent au niveau du sol. Il importe de signaler que plusieurs insectes autres que *M. signatella* ont été observés dans les lots de fruits de rotra ramassés par terre (Rasamimanana, données non-publiées). Parmi eux, signalons *Nanophyes fasciolatus* (Curculionidae), *Trogoderma granarium* (Dermestidae) et *Rhizopertha dominica* (Bostrichidae). Ces insectes pourraient jouer le rôle de facilitateurs (Hawmons et al., 2009) en dégradant plus rapidement la pulpe de rotra avant l'infestation des graines par *M. signatella*.

#### ❖ Affinité de *M. signatella* vis-à-vis des fruits et graines de rotra

*M. signatella* présente une préférence claire pour les fruits et les graines mûres, à l'exception des fruits frais (2,86%), probablement à cause de la volatilité des substances répulsives contenues dans les fruits mûrs qui s'échappent plus facilement de la pulpe fraîche comparés aux fruits secs. *M. signatella* manifeste peu ou pas de préférence pour les fruits et graines verts à l'état frais ou secs. Ces résultats pourraient être dus à la teneur élevée de substances répulsives contenues dans les fruits non mûrs (semaine 1 à 3) où l'huile essentielle est produite en plus grande quantité que chez les fruits mûrs (semaine 12). Néanmoins, le test biologique montre que ces deux types d'huiles ont un pourcentage de répulsivité comparable contre l'insecte *M. signatella*. Ceci suggère que l'activité répulsive observée résulte plutôt de la quantité endogène en huiles essentielles que de la composition des huiles essentielles obtenues.

Selon Kim et al. (2003) et Nkouka (1995), les effets toxiques des extraits des plantes sont fonction de l'espèce de plante, de la dose du produit utilisé, de l'espèce d'insecte et aussi du temps d'exposition aux produits. Ainsi, les procédures proposées en vue d'éviter l'infestation des fruits de rotra par des insectes est de suivre certaines règles de bonne pratique de la récolte comme éviter autant que possible de ramasser les fruits qui sont tombés sur le sol. Etant

donné que les fruits de rotra sont récoltés par secouage des arbres, ils devraient être recueillis dans une sorte de bâche de protection afin d'empêcher leur contact sur le sol. Une fois récoltés, les fruits devraient être triés pour éliminer ceux qui sont infestés, nettoyés, dépulés et séchés. Après le séchage, il est conseillé de broyer les graines et de stocker sous forme de poudre car les insectes pondent et accomplissent leur cycle de développement à l'intérieur de la graine. Pour diminuer les risques d'infestation au cours du stockage, il pourrait être envisagé de diffuser en continu de l'huile essentielle répulsive contre l'insecte *M. signatella*. Cependant, l'huile essentielle choisie doit montrer une totale innocuité vis-à-vis du personnel qui gère le stock.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de l'année 2008, la maturation des fruits de rotra s'est déroulée pendant environ douze semaines pour le géotype R5. Deux phases de croissance sont clairement distinctes. Les sept premières semaines sont caractérisées par une augmentation du poids, de la taille et de la teneur en eau des fruits. A partir de la septième semaine, la teneur totale de solides solubles (TSS) de la pulpe augmente jusqu'en fin de maturation. Au cours de la maturation, l'acidité diminue, les chlorophylles se dégradent et d'autres pigments comme les anthocyanes, responsables de la coloration noir pourpre, apparaissent. Le rendement en huile essentielle de pulpe de rotra diminue progressivement pendant cette période. La teneur en sesquiterpènes et en produits oxygénés est élevée pendant la première semaine alors que celle des monoterpènes est maximale entre la troisième et la huitième semaine de maturation.

Les résultats du test de répulsivité ont montré que toutes les huiles essentielles extraites au cours de la maturation sont répulsifs contre *M. signatella*. La préférence de l'insecte pour les fruits mûrs serait plutôt liée à la baisse de la teneur en huile essentielle dans la pulpe. La répulsivité de l'huile essentielle contre *M. signatella* est dose-dépendante, le pourcentage de répulsivité optimal étant obtenu avec la plus faible dilution.

Le test de toxicité a démontré que l'huile de pulpe n'est pas toxique pour *M. signatella*. Néanmoins, son potentiel répulsif n'est pas spécifique de *M. signatella* car elle repousse également le charançon du riz, *Sitophilus oryzae*.

Comme l'huile essentielle de pulpe n'est disponible que pendant la période de fructification, l'huile de feuille de rotra pourrait être utilisée en substitution. Les feuilles de rotra sont pérennes, elles présentent aussi une forte répulsivité contre *M. signatella*. Les huiles extraites d'autres plantes comme *Cymbopogon nardus* et *Piper nigrum* constituent également de bons répulsifs contre cet insecte.

A partir de notre étude, quelques conseils pratiques pourraient être proposés aux paysans récolteurs et préparateurs de phytomédicaments afin d'obtenir des graines de rotra saines, indemnes d'infestation et de les protéger durant le stockage post-récolte :

Au niveau des collecteurs :

- ✓ Informer davantage les paysans de ne pas ramasser les fruits tombés sur le sol
- ✓ Etaler une bâche de protection pour recueillir les fruits de rotra après secouage des arbres
- ✓ Trier sévèrement en éliminant impérativement les graines infestées.

Au niveau de la manufacture :

- ✓ Utiliser de l'huile essentielle de feuille de rotra comme répulsif dans les stocks de graines. C'est une solution alternative à la lutte chimique. Pour cela, il faudrait réaliser un test de validation de la répulsivité à l'échelle industrielle par une application d'un diffuseur d'huile essentielle pour protéger le stock.

Des études supplémentaires sont nécessaires afin de :

- ✓ Tester par fumigation l'effet larvicide de l'huile essentielle de pulpe de rotra
- ✓ Tester l'effet répulsif contre d'autres insectes vecteurs de germes comme les moustiques
- ✓ Terminer l'identification de tous les constituants de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra
- ✓ Evaluer la toxicité de l'huile sur différents modèles animaux.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbot, W.S. 1925** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:266-267
- AFNOR, 1992** Recueil des normes françaises. Association Françaises de Normalisation, 4<sup>ème</sup> édition, Paris
- Anonyme, 1992** Charançon ou calandre des céréales. Fiche technique de la protection des cultures. Ministère de l'Agriculture - Ministère de la Recherche Scientifique. Fiche N°16
- Amin, M.R., Shahjahan, M., Eltaj, H.F., Iqbal, T.M.T., Alamgir, M. et Hossain, 2000** *Ban. J. Entomol.* 10 (1):1-13
- Arnason, J.T., Durst. T., Philogène, B.J.R. et Scott, L.M. 2008** Prospection d'insecticides phytochimiques de plantes tempérés et tropicales communes ou rares. *In : Biopesticides d'origine végétale 2<sup>ème</sup> édition* Regnault-Roger, C., Philogène B.J.R. et Vincent, C. (éds). TEC & DOC-Lavoisier, Paris, France, p550
- Asawalam, E.F. 2006** Insecticidal and repellent properties of *Piper guineense* seed oil extract for the control of *Zea mais* weevil, *Sitophilus zeamais*. *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* 5(3):1389-1394
- Asawalam, E.F., Emosairue, S.O. et Hassanali, A. 2006** Bioactivity of *Xylopiya aetiopica* (Dunal). A rich essential oil constituent on maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* 5(1):1195-1204
- Baloch, U.K. 1992** Integrated Pests Management in Food Grains. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Pakistan Agricultural Research Council (eds), Islamabad, Pakistan. pp. 117
- Beek, T. et Groot, A. 1986** Terpenoid antifeedants of natural origin. *Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas* 105:513-514
- Bekele, A.J. et Hassanali, A. 2001** Blend effects in the toxicity of essential oil constituents of *Ocimum kilmandscharicum* and *Ocimum kenyanense* (Labiatae) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry* 57:385-391
- Boiteau, P. 1985** Dictionnaire des noms malgaches de végétaux, Micro-édition n°85 04 10, Archives et documents, Muséum national d'histoire naturelle. pp 2027
- Boiteau, P. et Boiteau, L. A. 1993** Plantes médicinales de Madagascar, édition Karthala. p 92
- Bruneton, J. 1993** Pharmacognosie et phytochimie. *In : Plantes médicinales.* Lavoisier, Paris, France, 278-279

- Bruneton, J. 1999** Pharmacognosie, phytochimie. *In* : Plantes médicinales 3<sup>ème</sup> édition, TEC&DOC, Lavoisier, Paris, France
- Casida, J.H. 1990** Pesticide mode of action, evidence for implications of a mite number of biochemical targets. *In*: Pesticides and alternatives, innovative chemical and biological approaches to pest control. Casida J.E. (ed.). Elsevier, Amsterdam, NL, pp 11-22
- Çelik, H., Özgen, M., Serçe, S. et Kaya, C. 2008** Phytochemical accumulation and antioxydant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Sci. Hort.* 117: 345-348
- Coombe, B.G. 1992** Research on development and ripening of the grape berry. *American J. of Oenology and Viticulture* 43:101-110
- Cruz, J.F., Troude, F., Griffon, D. et Hébert, J.P. 1988** Conservation des grains en régions chaudes, *In* : Techniques rurales en Afrique. 2<sup>ème</sup> éd., France, p545
- Cseke, L.J. et Kaufman, P.B. 1999** How and why these plants are synthesized by plants. *In*: Natural Products from Plants, Cseke L.J., Kaufman P.B, Warber S., Duke J.A. et Briemann H.L. (eds), CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp 37-90
- Deloire, A. 2008** Le raisin (2) : La croissance de la baie (*Vitis vinifera* L.)
- Encyclopédie Microsoft Encarta, 2003** Microsoft corporation
- Farrer, G. 2006** La bible de l'aromathérapie. Editions Trédaniel
- Flamini, G., Bader, A., Cioni, P.L., Katbeh-Bader, A., et Morelli, I. 2004** Composition of the essential oil of leaves, galls, and ripe and unripe fruits of Jordanian *Pistacia palaestina* Boiss. *J. Agric. Food Chem.* 52: 572-576
- Gattefossé, R.M. 1937** Aromathérapie
- Gérard, B. 1978** L'olivier. p464
- Guis, M. et Botondi, R. 1997** Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *J Amer Soc Hort Sci* 122: 748-751
- Gupta, A., Upadhaya, R.K., Saxena, P.N. 2001** *J. Scientific and Ind. Res.* 60:668
- Gwinner, J., Harnisch, R. et Mück, O. 1996** Principaux insectes nuisibles des denrées stockées. *In* : Manuel sur la manutention et la conservation des graines après récolte. Eschborn RFA (ed). p 388
- Hassanali, A., Wandu, L., Ole, W., Sitayo, N., Moreka, L., Nokoe, S., et Chapya, A. 1990** Weevil repellent constituents of *Ocimum suave* leaves and *Eugenia caryophylla* cloves used as grain protectant in parts of East Africa. *Discovery and Innovation* 2:91-95
- Hawmons, D.L., Kurtural, S.K., Newmann, M.C. et Potter, D.A. 2009** Invasive Japanese beetles facilitate aggregation and injury by a native scarab pest of ripening fruits. *Proc. Nat.*

*Acad. Sci.* 106 (10): 3686-3691

**Herent, M.F., De Bie et Tilquin, B. 2007** Determination of new retention indices for quick identification of essential oils compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43:886-892

**Howe, R.W. 1965** *Nutr. Abs. Rev.* 35:285

**Iland, P.G., Cynkar, W., Francis, I.L., Williams, P.J. et Coombe, B.G. 1996** Optimization of methods for the determination of total and red free glycosyl-glucose in black grapes berries of *Vitis vinifera*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2:171-178

**Iland, P.G., Ewart, A., Sitters, J., Markides, A. et Bruer, N. 2000** Technics for chemical analysis and quality monitoring during winemaking. (Patrick Iland, ed), Wine Promotions, Campbelltown, SA

**Isman, M.B. 2000** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608

**Jembere, B., Obeng-Ofori, D., Hassanali, A. et Nyamasyo, G.N.N. 1995** *Bull. Entomol. Res.* 85:361

**Jerkovic, I., Radonic, A., et Borcic, I. 2002** Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils from Croatian *Myrtus communis* L. during a one-year vegetative cycle. *J. Ess. Oil Res.* 14: 266-270

**Jungmin, L., Christopher, R. et Ronald, E.W. 2008** Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem.* 110: 782-786

**Kabaru, J.M. et Gichia, L. 2001** Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove tree *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) Lam. against three arthropods. *Afr. J. Sci. Tech.* 2(2):44-49

**Kouninki, H., Ngamo, L.S.T., Hance, T. et Ngassoum, M.B. 2007** Potential use of essential oils from local Cameroonian plants for the control of red flour weevil *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebridae). *Afr. J. Food. Agric. Nut. Dev.* 7(5):1-15

**Kumar, A., Ilavarasan, R., Jayachandran T., Daecaraman M., Aravindan P., Padmanabhan, N. et Krishan, M. R. 2008** Antidiabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Plants Res.* 2(9):246-249

**Lale, N.E.S. et Alaga, K.A. 2001** Exploring the insecticidal, larvicidal and repellent properties of *Piper guineense* Schum et Thonn seed oil for the control of rust-red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) in stored pearl millet *Pennisetum glaucun* (L.). *Braz. J. Plant Dis. Protect.*, 108(3):305-313

- Lwande, W., Hassanali, A., Mcdowelle, P.G., Moreka, L., Nokoe, S.K. et Waterman, P.G. 1992** Constituents of *Commifera rostrata* and some of their analogues as maize weevil, *Sitophilus zeamais* repellents. *Insect Science and its Application* 13: 679-683
- Matthews, G.A. et Hislop, E.C. 1993** Insecticide application in the stores. *In: Application technology for crop protection*, Matthews G.A. et Hislop E.C. (eds), CAB, London, RU, p305
- Mc Donald, L.L., Guy, R.H. et Speirs, R.D. 1970** Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insects, United States Dept. of Agriculture Market Research. p. 882
- McCarron, M., Mills, A.J. Whittaker, D. Sunny, T.P. et Verghese, J. 1995** Comparison of the monoterpenes derived from green leaves and fresh rhizomes of *Curcuma longa* L. from India. *J. Flav. Frag.*, 10: 355-357
- Minguez, M. et Hornero, M.D. 1994** Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annum* cv Bola and Agridulce. *J. Agr. Food Chem.* 42: 38-44
- Morton, J.F. 1987** Jambolan. *In: Fruits of warm climates.* pp375-378
- Mukesh, K.C. 2007** Toxicity of essential oil from *Cuminum cyminum* (Umbelliferae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) against stored-product beetle *Triboleum castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Elec. J. Envir. Agric. Food Chem.* 6(1):1719-1727
- Muruganandan S., Srinivasan, K., Chandra, S., Tandan, S. K., Lal, J. et Raviprakash, V. 2001** Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. *Fitoterapia* 72(4):369-375
- Niber, T.B. 1994** The ability of powders and slurries from ten plant species to protect stored grain from attack by *Prostephanus truncatus* Horn Coleoptera: Bostrichidae and *Sitophilus oryzae* L. *J. Stored. Prod. Res.* 30(4):297-301
- Obeng-Ofori, D. et Reichmuth, C. 1997** Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored product coleopteran. *Int. J. Pest Manag.* 43:89-94
- Ogendo, J.O., Kostyukovsky, M., Ravid, U., Matasyoh, J.C., Deng, A.L., Omolo, E.O., Kariuki, S.T. et Shaaya, E. 2008** Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. *J. Stored Prod. Res.* 44: 328-334
- Palevich, D. et Cracker, L. 1994.** Volatile oils as potential insecticides. *The Herb, Spice, and Medicinal Plant Digest* 12(2):1-4
- Peterson, C. et Coats, J. 2001** Insect repellents: past, present and future. *In: Pesticide Outlook*, 154-158

- Prates, H.T., Santos, J.P., Waquil, J.M., Fabris, J.D., Oliveira, A.B. et Foster, J.E. 1998** Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* and *Triboleum castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* 34: 243-249
- Rabehaja, R.D.J. 2007** Contribution à la valorisation de *Cymbopogon giganteus* (Chiov.) *madagascariensis* (A.camus). Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Ecole Supérieure Polytechnique, Filière Génie chimique, Université d'Antananarivo
- Rakotondravony, A. J. 2006** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles de *Ravensara aromatica* dans la forêt de Raboana district de Moramanga. Mémoire d'Ingénieur Agronome, ESSA, Département: Industrie Agricole et Alimentaire, Université d'Antananarivo
- Ramanoelina, A.R.P 1997** Industries des plantes aromatiques : huiles essentielles et extraits, Département Industries Agricoles et Alimentaires, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d' Antananarivo
- Ramanoelina, A.R.P., Rasoarahona, J.R. et Gaydou, E.M. 2006** Chemical composition of *Ravensara aromatica* Sonnerat. Leaf essential oil from Madagascar. *J. Essent. Oil Res.*18
- Rasendramiadana, F. 2009** Influence de l'âge de la feuille et de la plante sur le rendement et la qualité de l'huile essentielle de ravintsara (*Cinnamomum camphora* L.). Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Option Physiologie Végétale, Université d'Antananarivo
- Ratsimamanga, A.R., Ratsimamanga, S., Rasoanaivo, P., Leboul, J., Provost J., Reisdorf, D. 1997** Mixtures derived from grains of *Eugenia jambolana* Lamarck, preparation and use of said mixtures and some of their constituents as medicaments. WO Patent 97/28813
- Ratsimanohitra, B. 2001** Contribution à l'étude de la variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Helichrysum gymnocephalum*. Mémoire de fin d'étude, Département Industries Agricoles et Alimentaires, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo
- Svoboda, K.P. et Hampson, J.B. 1999** Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK.
- Trebitch, T. et Goldschmidt, E.E. 1993** Ethylene induced *de novo* synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme in citrus fruit peel. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 9441-9445
- Tripathi, A.K.V. Prajapati, K.K. Aggarwal, S.P.S. Khanuja, et Kumar, S. 2001** Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored product beetles. *J. Econ. Entom.*, 93: 43-47

- Tsao, R.S., Lee, P.J. Rice, C. et Jensen, J.R. 1995** Monoterpenoids and their synthetic derivatives as leads for new insect control agents. *In: Synthesis and chemistry of agrochemicals IV*. Baker D.R., Fenyes J.G. et Asarab G.S. (eds). American Chemical Society, Washington DC, USA, 312-324
- Uceda, M. et Hermoso, M. 1998** La calidad del aceite de oliva. *In El cultivo del olivo*. Barranco. D; Fernandez-Escobar R. et Rallo L. (eds). Junta de Andalucía ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain. pp547-572
- Veigas, J.M., Mandayam, S.N., Padmure, M.L. et Bhagyalakshmi, N. 2008** Chemical nature, stability and bioefficacies from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. *Food Chem.* 105: 619-627
- Vijayanand, P., Jagan Mohan Rao, L. et Narasimham, P. 2001** Volatile flavour components of jamun fruit (*Syzygium cumini* L.). *Flav. Fragr. J.* 16: 47-49
- Wissem, A.W., Baya, M. et Brahim, M. 2009** Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chem.* 112: 621-626

#### REFERENCES WEBIOGRAPHIQUES

- <http://plantsdatabase.com/members/Thaumaturgist>
- <http://www.visiflora.com>
- <http://www.worldagroforestrycentre.org>
- <http://www.crcv.com>
- <http://www.aroma-zone.com>
- <http://www.issg.org/database/species/ecology>
- <http://www.libertynatural.com>
- <http://www.wikipedia.org/wiki/Curculionidae>

## ANNEXES

### Annexe 1: Conditions opératoires

L'échantillon à analyser est introduit dans la chambre d'injection où il est vaporisé de façon homogène.

- Quantité injectée : 0,1µl
- Programmation de la température du four : 50 à 250°C à raison de 5°C/min
- Pression P du gaz vecteur (H<sub>2</sub>): 0.33 bar
- Température de l'injecteur et du détecteur : 230°C
- Type de détecteur : FID
- Type de colonne : CP-WAX 52cB

### Annexe 2: Identification des constituants

Le Laboratoire d'Analyse des Huiles Essentielles (LAHE) de l'IMRA utilise des produits de référence appelés EMAG (C<sub>5</sub> à C<sub>25</sub>) pour identifier les constituants des huiles essentielles. En effet, les études de reproductibilité effectuées ont permis de démontrer que ces indices d'EMAG ne présentent aucune variation significative par rapport aux divers facteurs (Herent et al., 2007).

L'identification des principaux constituants par les indices d'esters requiert la réalisation d'une analyse chromatographique en phase gazeuse. Après injection des esters méthyliques d'acides gras et des huiles essentielles à analyser, on obtient des chromatogrammes. Les indices d'esters I(x) des différents constituants sont déterminés selon la formule suivante :

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

Avec,

I(x) = indice d'ester du composé x

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

n+1 = nombre de carbone d'ester méthylique d'acide gras élué après x

T<sub>x</sub>, T<sub>n</sub>, T<sub>n+1</sub> = températures de sortie du composé x et des esters méthyliques élués avant et après x (elles sont obtenues à partir de la relation : T<sub>r</sub> (°C) = 50 + 5 t<sub>r</sub> (x) avec t<sub>r</sub> (x) : le temps de rétention du composé x et la relation de I(x)

Les I(x) sont ensuite comparés à ceux d'une banque d'indices correspondant à des composés témoins constitués par le laboratoire (Rabehaja, 2007).

**Annexe 3: Liste des constituants chimiques non identifiés de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra au cours de la maturation**

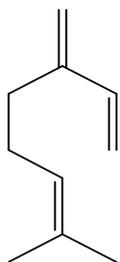
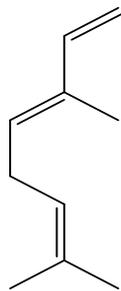
<i>Constituants</i>	<i>Semaine</i>				
	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>12</i>
1	0,048	0,05	0,059	0,302	0,203
2	0,046	0,061	0,052	0,174	0,349
3	0,077	0,056	0,853	0,656	0,299
4	0,38	1,405	0,079	0,148	0,124
5	0,17	0,039	0,141	0,168	0,272
6	0,154	0,13	0,11	0,127	0,246
7	0,365	0,032	0,112	0,107	0,478
8	<b>2,666</b>	0,038	0,121	0,051	0,197
9	0,073	0,252	0,066	0,177	0,496
10	0,056	0,029	1,612	0,113	<b>11,477</b>
11	0,045	0,082	0,449	<b>2,428</b>	0,233
12	<b>10,257</b>	0,03	1,104	0,675	<b>4,087</b>
13	0,088	0,14	0,147	0,579	<b>5,479</b>
14	0,036	0,276	0,087	0,106	0,348
15	0,032	1,228	0,085	0,478	0,226
16	0,076	0,106	0,11	0,052	0,834
17	0,117	0,146	0,117	0,103	<b>11,094</b>
18	0,735	0,031	0,08	0,105	0,861
19	0,031	0,042	0,098	0,191	0,178
20	0,096	0,095	0,055	0,157	1,964
21	0,061	0,073	0,132	0,089	0,136
22	0,05	0,059	0,824	0,186	1,047
23	0,034	0,06	0,086	0,144	0,634
24	0,125	0,062	0,066	0,76	1,402
25	0,036	0,054	0,116	0,098	0,862
26	0,249	0,036	0,246	0,072	0,171
27	<b>1,14</b>	0,038	0,133	0,093	0,41
28	0,116	0,649	0,094	0,098	0,329
29	0,066	0,094		0,051	0,339
30	0,442	0,051		0,156	0,336
31	0,28	0,042		0,226	0,184
32	0,614	0,095			0,859
33	0,246	0,087			1,147
34	0,881	0,029			0,579
35		0,078			<b>3,53</b>
36		0,069			0,568

**Annexe 3: Liste des constituants chimiques non identifiés de l'huile essentielle extraite de pulpe de rotra au cours de la maturation (Suite)**

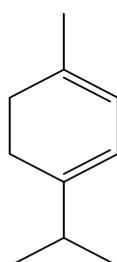
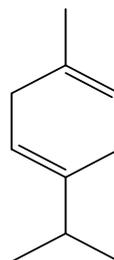
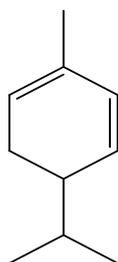
37		0,032			<b>2,018</b>
38		0,041			0,376
39					1,026
40					0,155
41					0,235
42					0,279
43					0,13
44					0,227
45					0,166
46					0,188
47					0,162
48					1,091
49					0,227
50					1,082
51					<b>3,514</b>
<b>Total</b>	<b>19,888</b>	<b>5,917</b>	<b>7,234</b>	<b>8,87</b>	<b>62,854</b>

## Annexe 4: Structure de quelques constituants chimiques des huiles essentielles

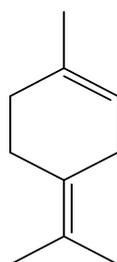
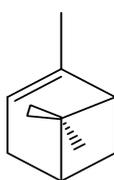
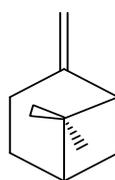
## 1-MONOTERPENES

 $\beta$ - MyrcèneTrans- $\beta$ -Ocimène

Limonène

 $\alpha$ - Terpinène $\gamma$ -Terpinène $\alpha$ - Phyllandrène

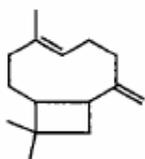
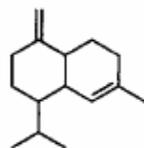
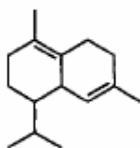
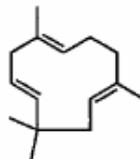
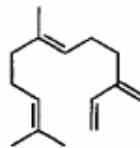
Terpinolène

 $\alpha$ -Pinène $\beta$ -Pinène

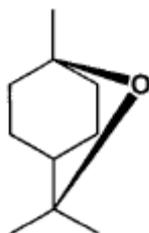
Camphène



## 2-SESQUITERPENES

 $\beta$ -Caryophyllene $\gamma$ -Cadinene $\delta$ -Cadinene $\alpha$ -Humulene*E*- $\beta$ -Farnesene

## 3-MONOTERPENES OXYGENES



1,8-Cineole

### Annexe 5 : Teneur relative des constituants chimiques des huiles essentielles de substitution

Constituants	Girofle	Citronnelle	Feuille de rotra	Pin	Poivre noir	<i>Psidium altissima</i>	Poivre vert	<i>Lantana camara</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Eucalyptus giganteus</i>
<b>β –myrcène</b>	-	<b>18,731</b>	<b>2,227</b>	<b>0,114</b>	<b>6,602</b>	<b>6,988</b>	<b>4,938</b>	<b>1,418</b>	<b>0,545</b>	-
α –fenchène	-	-	0,041	-	-	-	-	0,39	-	-
<b>cis- β -ocimène</b>		1,169	<b>22,458</b>	-	0,044	0,793	0,257	0,657	0,325	-
<b>trans- β -ocimène</b>		0,677	<b>10,901</b>	-	0,286	-	-	1,588	0,077	-
<b>1-8-cinéole</b>		-	-	0,091	0,073	<b>5,033</b>	0,087	<b>7,855</b>	<b>76,346</b>	0,181
α –terpinène	-	-	0,06	1,722	-	1,015	0,021	0,323	0,047	-
<b>Limonène</b>	-	-	<b>2,145</b>	<b>14,163</b>	<b>20,989</b>	<b>2,635</b>	<b>16,981</b>	1,484	<b>3,689</b>	<b>32,42</b>
α -phellandrène	-	-	-	-	0,065	-	0,027	-	-	-
β -phellandrène	-	-	0,14	0,037	0,248	0,092	0,178	0,371	0,114	-
<b>α –pinène</b>	-	-	<b>40,523</b>	<b>62,808</b>	<b>7,706</b>	<b>3,374</b>	<b>32,108</b>	<b>6,815</b>	<b>11,114</b>	-
Citronellal	-	0,328	-	-	-	-	-	-	-	-
γ –terpinène	-	-	0,676	-	0,101	0,325	0,928	0,051	0,051	0,55
<b>p-cymène</b>	-	-	<b>0,103</b>	<b>0,196</b>	<b>0,372</b>	-	<b>0,278</b>	<b>0,228</b>	<b>0,277</b>	<b>0,296</b>
Terpinolène	-	-	0,834	0,479	0,214	-	-	0,095	0,122	0,082
Linalool	0,06	1,17	0,125		0,336	0,685	0,171	0,414	0,084	-
<b>α -humulène</b>		-	<b>2,021</b>	<b>2,186</b>	-	-	-	-	-	-
Isopulégol	-	1,404	-	-	-	-	-	-	-	-
β –élémente	-	0,298	-	0,216	1,433	1,313	0,668	0,225	0,042	-
<b>δ –élémente</b>	-	-	-	-	<b>2,694</b>	0,614	1,152	0,096	-	-
<b>Eugénol</b>	<b>76,398</b>	-	0,065	-	-	0,391	-	0,36	-	-
<b>β -caryophyllène</b>	<b>11,356</b>	0,283	<b>4,836</b>	0,615	<b>13,477</b>	<b>2,249</b>	<b>6,165</b>	1,254	0,039	-
aromadendrène		0,075	0,044	-	-	-	-	-	<b>1,096</b>	-
Camphène	-	-	0,157	0,891	0,825	0,514	0,895	0,062	-	-
<b>β –pinène</b>	-	-	1,429	<b>11,776</b>	<b>17,356</b>	<b>42,161</b>	<b>15,841</b>	<b>4,342</b>	0,454	-
α –copaène	0,119	-	0,882	-	0,14	0,323	0,085	0,418	-	-
Tricyclène	-	-	-	0,255	-	-	-	-	-	-
terpinène-4-ol		-	0,092	-	-	-	-	<b>8,487</b>	0,054	0,159
aromadendrène		-	0,22	-	-	-	-	-	-	-
<b>Néral</b>	-	<b>28,649</b>	0,135	-	-	-	-	<b>2,918</b>	-	-
α –humulène		1,218	-	-	0,938	0,931	0,426	0,114	0,126	-
<b>Géranial</b>		<b>37,164</b>	0,255	-	-	-	-	-	-	-
acétate de géranyle		1,003	0,358	-	0,051	0,06	0,018	0,038	0,167	-
β –citronellol	-	0,252	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>acétate d'eugényle</b>	<b>9,867</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nérol	-	0,111	-	-	-	-	-	-	-	-
α –terpinéol	-	-	0,943	0,199	0,182	1,12	0,053	0,524	-	0,044
<b>Géraniol</b>	-	<b>3,548</b>	-	0,033	-	0,053	-	-	0,194	-
<b>caryophyllène oxyde</b>	0,282	0,045	0,431	0,067	-	-	0,037	0,132	-	-
germacrène-D		-	0,758	-	1,512	<b>2,018</b>	0,728	0,033	-	-
β –sélinène	-	-	0,138	-	1,626	0,408	0,726	<b>4,278</b>	-	-
α –muurolène		-	0,189	-	-	0,198	-	-	0,027	0,077
γ –cadinène	-	-	0,094	0,03	1,128	0,999	-	0,071	-	0,463

**Annexe 5 : Teneur relative des constituants chimiques des huiles essentielles de substitution (suite)**

$\beta$ -cadinène	-	-	0,05	-	-	-	0,537	0,515	0,053	<b>2,585</b>
$\delta$ -cadinène	0,11	-	0,635	0,125	0,17	1,584	0,045	0,719	0,046	-
$\gamma$ -muurolène	-	-	-	0,068	-	-	0,03	-	-	-
Viridiflorol	-	-	0,069	-	-	-	-	0,107	-	-
terpinène-1-ol-4	-	-	-	0,172	-	0,255	-	-	-	-
benzoate de benzyle	-	-	0,103	-	-	-	-	-	-	-
néo-isopulégol	0,194	0,045	-	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -muurolène	-	-	0,452	-	0,148	1,35	-	-	-	-
Sabinène	-	-	-	0,069	0,269	0,368	0,189	<b>11,805</b>	0,036	-
$\delta$ -3-carène	-	-	-	1,57	<b>18,767</b>	<b>2,038</b>	<b>15,293</b>	0,319	-	-
<b>Davanone</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>22,822</b>	-	-
5-heptèn-2-one,6-méthyl	-	1,908	-	-	-	-	-	-	-	-
Bornéol	-	-	-	1,014	-	-	-	-	-	-
cyclosativène	-	-	-	-	0,379	-	-	-	-	-
$\alpha$ -gurjunène	-	-	-	-	0,091	-	0,055	-	-	-
$\alpha$ -cubébène	0,097	-	-	-	-	0,035	0,039	0,217	-	0,039
cyclosativène	-	-	-	-	-	-	0,203	-	-	-
Camphre	-	-	-	-	-	-	-	0,048	-	-
<b><math>\beta</math>-bisabolène</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>3,34</b>	-	-
trans-nérolidol	-	-	-	-	-	-	-	0,227	-	-
spathuléol	-	-	-	-	-	-	-	0,994	-	-
$\delta$ -cadinol	-	-	-	-	-	-	-	1,938	-	-
$\alpha$ -cadinol	-	-	-	-	-	-	-	1,122	-	-
<b>trans-pinocarvéol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1,283</b>	-
<b>globulol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,447</b>	-
cis-limonène oxyde	-	-	-	-	-	-	-	-	0,292	-
<b>3,9-epoxy-p-mentha-1,8(10)-diène</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1,721</b>
alcool périllique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,238
<b>trans-p-mentha-2,8-dienol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>15,079</b>
<b>cis-p-mentha-2,8-dienol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>6,754</b>
trans-isopiperitenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,253
<b>trans-p-mentha--1(7)8-dien-2-ol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>13,558</b>
<b>trans-carvéol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2,367</b>
cis-carvéol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,113
p-cymen-8-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,487
<b>cis-p-mentha--1(7)8-dien--2-ol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>11,974</b>
cis-isopiperitenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,125
<b>carvone</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2,166</b>
NI total	0,398	1,703	4,497	1,075	1,641	19,105	0,838	10,743	2,616	7,974
Total	98,881	99,781	99,086	99,971	99,863	99,027	99,997	99,957	99,763	99,705

**Title :** Repellent activity of rotra, *Syzygium cumini* L. (Myrtaceae), pulp essential oil against the stored grain pest *Myocalandra signatella*

**Author :** RASAMIMANANA Stelina

### ABSTRACT

The rotra kernels used for the preparation of the antidiabetic Madeglucyl<sup>®</sup> were infested by insects during their storage. Among these pests, the most frequent is a Curculionidae identified as *Myocalandra signatella*.

This insect was incorporated along the commodity chain particularly during fruit harvesting. Surprisingly, green fruits were rarely infested by pest contrary to ripe fruits, suggesting a higher content of repellent compounds within the pulp of unripe fruits. The monitoring of morphometric and physico-chemical parameters during fruit ripening indicated a substantial increase of the fresh weight, water and anthocyanins contents and °Brix. Conversely, total chlorophylls and titratable acidity decreased. Essential oil yield of rotra pulp dropped from 0.7 to 0.02% during the maturation of rotra fruits. Pulp oil was mainly constituted of sesquiterpens (43.02%) and oxygenated products (36.08%) at the onset of maturation. Then, monoterpens became predominant between week 3 and 8 averaging 87.45%. Sesquiterpens (29.32%) and new unidentified compounds (62.85%) were the major compounds at the end of the maturation period. All pulp oils extracted during the maturation time displayed good repellency against *M. signatella* with an optimal repellency index (84.39%) during the third week. Insects were more sensitive at the lowest dilution.

These result showed that insect preference for ripe fruits could be partially explained by their lowest content in essential oil. Moreover, the repellent effect of the pulp oil against *Sitophilus oryzae* (94.88%) showed its non specificity to *M. signatella*.

Pulp essential oil could be replaced by leaf essential oil which is available along the year and have comparable repellent activity against *M. signatella* or by other plant species such as *Cymbopogon nardus* and *Piper nigrum*.

**Key words:** essential oil, fruit maturation, grain storage, harvesting, repellent activity, *Syzygium cumini*.

**Supervisor:** Dr Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA

**Titre : Evaluation de l'activité répulsive de l'huile essentielle de pulpe de rotra *Syzygium cumini* L. (Myrtaceae) contre l'insecte dévoreur de graines *Myocalandra signatella***

**Auteur :** RASAMIMANANA Stelina

**RESUME**

Les graines de rotra (*Syzygium cumini* L.) destinées à la préparation du phytomédicament antidiabétique Madeglucyl<sup>®</sup> sont attaquées par des insectes nuisibles dont le plus fréquent est un Curculionidae identifié comme *Myocalandra signatella*.

L'identification du moment d'infiltration de cet insecte, le test de préférence pour les fruits de rotra par *M. signatella*, la caractérisation de la maturation par un suivi des paramètres morphométriques et physico-chimiques des fruits de rotra, l'extraction et l'analyse des huiles essentielles de pulpe de rotra par CPG/DIF ont été réalisés. Ces huiles essentielles extraites au cours de la maturation sont ensuite évaluées pour leur activité biologique contre *M. signatella*.

Les insectes s'infiltrent dans la filière d'approvisionnement au cours du ramassage des fruits, se retrouvant par la suite dans le stock de graines de la manufacture. Contrairement aux fruits mûrs, les fruits verts ne sont que très rarement attaqués par l'insecte suggérant une propriété répulsive de la pulpe des fruits verts. Au cours de la maturation des fruits de rotra, les résultats montrent une augmentation du poids, de la teneur en eau et en anthocyanes ainsi que du TSS. En contrepartie, la teneur en chlorophylles et l'acidité titrable diminuent. Le rendement en huile essentielle de la pulpe diminue progressivement de 0,7 à 0,02% au cours de la maturation du fruit de rotra. L'huile extraite de la pulpe est constituée principalement de sesquiterpènes (43,02%) et de produits oxygénés (36,08%), en début de maturation. Ensuite, les monoterpènes sont prépondérants entre les semaines 3 et 8 avec une teneur moyenne de 87,45%. La fin de la maturation est marquée par les sesquiterpènes (29,32%) et de nouveaux composés non-identifiés (62,85%). Toutes les huiles extraites de la pulpe au cours de la maturation possèdent une activité répulsive contre *M. signatella* avec un pourcentage de répulsivité optimal de 84,39% pendant de la troisième semaine. Ces résultats indiquent que la préférence de l'insecte pour les fruits mûrs pourrait être expliquée, au moins partiellement, par leur faible teneur en huile essentielle. Par ailleurs, l'effet répulsif de cette huile sur *Sitophilus oryzae* (94,88%) indique sa non-spécificité pour *M. signatella*.

Dans cette étude, nous avons conclu que l'huile essentielle de pulpe pourrait être substituée par l'huile extraite de feuilles de rotra, disponible pendant toute l'année et présentant une forte répulsivité (78,93%) contre *M. signatella* ou par d'autres plantes comme *Cymbopogon nardus* et *Piper nigrum*.

**Mots clés :** *activité répulsive, huile essentielle, maturation des fruits, récolte, stock de graines, Syzygium cumini.*

**Encadreur :** Dr Aro Vonjy RAMAROSANDRATANA