

## Rôle de la peroxydation des lipides dans la sensibilité à la cryoconservation des semences de caféier (*Coffea arabica*)

Stéphane DUSSERT<sup>(1)\*</sup>, Nathalie CHABRILLANGE<sup>(1)</sup>,  
Jean-Luc MONTILLET<sup>(2)</sup>, Gérard ROCQUELIN<sup>(3)</sup>,  
Florent ENGELMANN<sup>(1)</sup>, Michel NOIROT<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Diversité et génome des plantes cultivées, UMR CIRAD-IRD-ENSAM-INRA,  
911, Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

<sup>(2)</sup> Laboratoire de radiologie végétale, CEA,  
13108 Saint Paul Lez Durance Cedex, France

<sup>(3)</sup> Nutrition, alimentation, sociétés, IRD, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

**Abstract - Role of lipid peroxidation in the sensitivity of coffee (*Coffea arabica*) seeds to cryopreservation.** Because of the non-orthodox storage behaviour of their seeds, coffee (*Coffea* spp.) genetic resources are conventionally conserved as trees in field genebanks. However, since field collections are very costly to maintain and leave the material exposed to biotic and abiotic hazards, the search for alternative methods to field conservation has become a priority for coffee genetic resources. Cryopreservation is the only technique available to ensure cost-effective and safe long-term conservation of coffee germplasm. For *C. arabica*, which is autogamous and therefore seed propagated, attention has been given to seed cryopreservation. Previous studies have allowed to identify the optimal seed water content, cooling and thawing procedures for *C. arabica* seed cryopreservation. Despite these efforts, seed survival after liquid nitrogen exposure remains very low and it has been proposed that *C. arabica* seeds could suffer from post-thaw oxidative stress. In order to test this hypothesis, the effect of liquid nitrogen exposure on seed lipid peroxidation has been studied in the present work. The analysis of fatty acid composition indicates that two fatty acids which can undergo peroxidation during an oxidative stress are found in *C. arabica* seeds. These fatty acids are linoleic acid, which represents 35 % of fatty acids, and linolenic acid, which represents only 1 % of fatty acids. The identification of linoleic acid as the major potential target for an oxidative attack in *C. arabica* seeds, allowed to select two markers of lipid peroxidation in those seeds: 4-hydroxynonenal (4-HNE) and pentane. No significant difference was observed between desiccated seeds and seeds desiccated and exposed to liquid nitrogen for the evolution of the 4-HNE content of seeds during their culture under germination conditions. In both cases, an increase in 4-HNE content, from 110 to 210 nmol.g<sup>-1</sup> dry weight (dw), was observed during the first 40 h of culture, fol-

---

\* Correspondance et tirés à part : [dussert@mpl.ird.fr](mailto:dussert@mpl.ird.fr)

lowed by a progressive decrease to 50 nmol.g<sup>-1</sup> dw between 40 and 180 h. Similarly to the 4-HNE content, no significant difference in the evolution of the total hydroperoxide content was observed between control and frozen/thawed seeds. A significant effect of the time in culture was also observed. Moreover, the pattern of evolution of the seed hydroperoxide content was very similar to that obtained for the 4-HNE content: an increase from 258 to 367 nmol.g<sup>-1</sup> dw between 28 and 32 h, followed by a significant decrease to 66 nmol.g<sup>-1</sup> dw at 56 h. The analysis of the hydroperoxide composition shows that the same hydroperoxides were present in desiccated seeds and seeds desiccated and exposed to liquid nitrogen. Moreover, the proportion of each hydroperoxide was identical in control and cryopreserved seeds. A low but constant ethylene production was observed in the headspace of culture containers. By contrast, no alkanes were detected, independent of the seed treatment. In conclusion, this study suggests that the very high sensitivity of coffee seeds to cryopreservation is not directly associated with the occurrence of an oxidative stress during post-thawing reimplantation.

#### seed / cryopreservation / *Coffea* / lipids / oxidation

**Résumé** - Afin d'étudier si la diminution de la viabilité des semences de *C. arabica* lorsqu'elles sont exposées à l'azote liquide est associée à un stress oxydatif, l'évolution du niveau d'oxydation des lipides au cours des premiers jours de culture des semences a été comparée chez des semences déshydratées jusqu'à la teneur en eau optimale pour leur cryoconservation et des semences déshydratées et exposées à l'azote liquide. La peroxydation des lipides a été étudiée par l'analyse de la teneur et de la composition en hydroperoxydes dans les semences et par le dosage de deux sous-produits de leur décomposition, le 4-hydroxynonanal (4-HNE) et le pentane. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que la perte de viabilité des semences de *C. arabica*, lorsqu'elles sont immergées dans l'azote liquide et réhydratées rapidement (de manière non contrôlée), ne semble pas directement associée à une augmentation de la peroxydation des lipides. En effet, aucune différence significative n'a été observée entre les semences déshydratées et les semences déshydratées et exposées à l'azote liquide pour l'évolution de leurs teneurs en hydroperoxydes et en 4-HNE au cours de la réhydratation ainsi que pour leur composition en hydroperoxydes.

#### semence / cryoconservation / *Coffea* / lipides / oxydation

### 1. INTRODUCTION

Les semences des caféiers (*Coffea* spp.) n'ayant pas un comportement orthodoxe en conservation [13], [23], les ressources génétiques de ces espèces sont conservées dans des collections aux champs. À cause des risques élevés d'érosion génétique associés à ce mode de conservation et de son coût élevé, le développement de nouvelles technologies pour la conservation à long terme des ressources génétiques de ces espèces est une priorité [7]. Pour les caféiers, comme pour toutes les espèces à semences non-orthodoxes, la seule tech-

nologie actuellement disponible pour la conservation à long terme de leurs ressources génétiques, à faible coût et en toute sécurité, est la cryoconservation. Pour l'espèce cultivée *C. arabica*, qui est autogame et dont les ressources génétiques sont multipliées par les semences, la priorité doit être donnée au développement d'un protocole de cryoconservation des semences.

Les semences des caféiers ne peuvent tolérer une exposition aux très basses températures que si elles sont préalablement déshydratées de manière à extraire toute l'eau cristallisable de leurs tissus [11]. La teneur en eau non-cristallisable des semences de *C. arabica* est de 0,21 g H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> ms [11]. Étant donné que les semences de cette espèce supportent sans dommages une dessiccation jusqu'à une teneur en eau de 0,11 g H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> ms [9], [12], [13], il pouvait être attendu qu'elles tolèrent une exposition à la température de l'azote liquide (-196 °C) après dessiccation jusqu'à leur teneur en eau non-cristallisable. Les travaux de nombreuses équipes ont pourtant montré qu'après dessiccation jusqu'à une telle teneur en eau et immersion dans l'azote liquide, les semences de *C. arabica* meurent [2], [8], [12]. L'optimisation du mode de refroidissement et de réchauffement ne permet d'obtenir qu'un faible taux de survie des semences de cette espèce après cryoconservation [8]. En revanche, un préconditionnement osmotique des semences, après leur décongélation et avant leur mise en culture, permet d'accroître fortement la proportion de semences cryoconservées se développant en plantules [10]. Cette avancée technologique a permis de tester la faisabilité de la mise en place d'une cryobanque de *C. arabica* au CATIE (Costa Rica). À ce jour, 50 des 76 accessions d'une *core collection* de cette espèce ont d'ores et déjà pu être cryoconservées avec succès. En revanche, les mécanismes physiologiques ou biophysiques impliqués, d'une part, dans la sensibilité des semences de *C. arabica* aux très basses températures et, d'autre part, dans l'effet bénéfique du conditionnement osmotique sur le développement en plantules des semences cryoconservées n'ont toujours pas été identifiés.

Sur la base de la littérature, deux hypothèses, qui ne sont pas exclusives, peuvent être proposées pour expliquer l'effet bénéfique d'un préconditionnement osmotique après exposition des semences de *C. arabica* aux très basses températures. Tout d'abord, le préconditionnement osmotique fait partie des traitements identifiés pour prévenir les dommages membranaires qui peuvent prendre place lors de l'imbibition de semences dont les systèmes membranaires ont été altérés et/ou ne sont pas dans une phase lamellaire fluide [22], [25]. D'autre part, il a été montré que le préconditionnement osmotique permet l'élimination des sous-produits toxiques de l'oxydation des lipides et le renforcement des mécanismes de protection contre les formes réactives de l'oxygène chez des semences riches en huile ayant subi un stress oxydatif lors d'un vieillissement accéléré [1]. L'induction d'un stress oxydatif par un cycle de congélation-réchauffement est un phé-

nomène qui a déjà été rapporté dans la littérature tant chez des tissus animaux [19] que végétaux [3], [4], [17], [21]. C'est donc cette seconde hypothèse qui a été testée dans les travaux présentés dans ce document.

Chez les semences, il est généralement admis que les stress oxydatifs sont initiés par une production incontrôlée au niveau des mitochondries de deux formes réactives de l'oxygène (FRO), l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène [18]. La présence simultanée de ces deux FRO et de métaux de transition ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) permet la génération d'une troisième FRO, le radical hydroxyle, extrêmement réactif, qui peut initier la peroxydation en chaîne des lipides polyinsaturés. Cette peroxydation en chaîne des lipides conduit à la formation d'hydroperoxydes, qui peuvent par la suite se décomposer en de nombreux types de molécules plus ou moins cytotoxiques, telles que des alcanes, des alcools, des aldéhydes et des époxydes. Un stress oxydatif peut ainsi être mis en évidence, soit par une augmentation de la teneur en hydroperoxydes dans les tissus étudiés, soit par le dosage de l'un des produits de leur décomposition.

Chaque hydroperoxyde ne pouvant conduire qu'à la formation d'un nombre limité de sous-produits, le choix de l'un de ces sous-produits comme marqueur de la peroxydation des lipides devrait toujours être conditionné par l'analyse préalable de la composition en acides gras initiale de l'organisme étudié. Par exemple, par sa facilité de mise en œuvre, le dosage colorimétrique du malonedialdéhyde (MDA) est le test le plus largement utilisé pour la mise en évidence d'un stress oxydatif chez les semences. Pourtant, le MDA apparaît ne pas être le marqueur le plus approprié pour étudier la peroxydation des lipides chez toutes les espèces dont les semences sont riches en acide linoléique et pauvres en acide linoléique puisqu'il dérive très majoritairement de l'oxydation des acides gras contenant au moins trois double-liaisons [14]. Ainsi, dans l'étude présentée dans ce document, la recherche d'une association entre la sensibilité aux très basses températures des semences de *C. arabica* et l'apparition d'un stress oxydatif a été menée par l'analyse combinée des hydroperoxydes et de certains marqueurs de leur décomposition, le 4-hydroxynonanal et le pentane, choisis en fonction de la composition en acides gras des semences de *C. arabica*.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Matériel végétal, dessiccation et cryoconservation

Un lot de semences de *C. arabica* variété Caturra en provenance du Costa Rica a été utilisé dans cette étude. Les semences ont été déshydratées jusqu'à 0,21 g  $\text{H}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}$  ms en les plaçant pendant 3 semaines dans une atmosphère à 78 % d'humidité relative (HR) de manière à retirer toute l'eau cristallisable

de leurs tissus [11]. Les protocoles employés pour la congélation, le réchauffement et la culture des semences ont été décrits précédemment par Dussert *et al.* [11].

## 2.2. Composition en acides gras des lipides totaux des semences

Les lipides totaux ont été extraits des semences selon la méthode décrite par Dussert *et al.* [11]. Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ont été obtenus par transméthylation d'environ 50 mg de lipides totaux avec 2 ml d'une solution à 7 % de trifluorure de bore dans du méthanol dans un bain-marie à 90 °C pendant 10 mn. Les EMAG ont été extraits avec 2 ml d'hexane et lavés deux fois avec 2 ml d'eau désionisée, puis séparés sur un chromatographe en phase gazeuse (Helwett Packard 6890) équipé avec une colonne capillaire BPX-70 (SGE, France). L'injecteur et le détecteur ont été maintenus à 230 °C, tandis que la température de la colonne a été fixée à 185 °C. Le gaz porteur était de l'hélium à 1 ml.min<sup>-1</sup>. L'identification des EMAG a été réalisée avec des standard commerciaux.

## 2.3. Dosage du 4-hydroxynonanal (4-HNE) dans les semences

Chaque semence analysée a été coupée en deux après prélèvement dans les cultures. La première moitié a servi à la mesure de la teneur en eau tandis que l'autre a été utilisée pour le dosage du 4-HNE. Chaque moitié de semence analysée a été broyée à 4 °C dans un mortier avec 1 ml de tampon d'extraction (20 mM Tris HCL, pH 7,4), 10 µl d'une solution de BHT (ButylHydroxyToluène 0,5 mM, dans de l'acétonitrile) et 100 mg de sable fin jusqu'à obtention d'un broyat homogène. Le broyat a été centrifugé à 3 000 g pendant 15 mn à 4 °C. Un aliquot de 200 µl du surnageant obtenu a été mélangé avec 10 µl de BHT, 650 µl de N-méthyl-phénylindol (7,725 mM dans une solution de méthanol/acétonitrile, 1:3 v/v). Après homogénéisation, 150 µl d'acide méthane sulfonique à 15,4 M ont été ajoutés. Le mélange a été à nouveau homogénéisé, incubé à 45 °C pendant 60 min puis centrifugé 15 mn à 15 000 g et à 4 °C. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 586 nm. Pour chaque extrait, cette absorbance a été corrigée par soustraction de l'absorbance d'un aliquot du même extrait, traité suivant le même protocole à l'exception de la première étape dans laquelle le N-méthyl-phénylindol a été remplacé par 650 µl de méthanol/acétonitrile (1:3 v/v). Une gamme de référence utilisant le 4-HNE-diéthylacétal comme standard a été réalisée pour la quantification de la teneur en 4-HNE dans les semences.

## 2.4. Dosage des hydroperoxydes dans les semences

Les acides hydroperoxy-octadécadiénoïques (HPODE) et hydroperoxy-octadécatriénoïques (HPOTE), libres et estérifiés, ont été analysés par HPLC après réduction en acides hydroxy-octadécadiénoïques (HODE) et

hydroxy-octadécatriénoïques (HOTE) selon la méthode décrite par Rustérucci *et al.* [20]. Pour chaque échantillon prélevé, 10 semences ont été broyées dans de l'azote liquide. La poudre obtenue a été transférée avant réchauffement dans 5 ml d'une solution de NaOH 0,2 N et 5 % (w/v) de NaBH<sub>4</sub> et homogénéisée immédiatement à 4 °C avec un ultraturax à pleine vitesse pendant 60 s. Les échantillons ont ensuite été congelés et stockés à -20 °C. L'extraction des HODE et HOTE a été réalisée selon le protocole décrit par Rustérucci *et al.* [20]. Un aliquot de l'extrait (50 µl) a été analysé par HPLC à phase directe (Waters, Millipore, St Quentin-Yvelines, France) en utilisant une colonne Zorbax rx-SIL (4,6 x 250 mm, Hewlett Packard, les Ullis, France) selon la méthode de Degoussée *et al.* [5]. Les stéréoisomères d'HODE et d'HOTE ont été séparés par élution isocratique dans l'hexane/diéthyl-éther/acide acétique (70/30/0,25 ; v/v/v) à un débit de 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. La détection a été réalisée en mesurant l'absorbance à 234 nm (système diénique). Les HODE et HOTE ont été identifiés en utilisant des standards [5] et leur quantification a été réalisée grâce à un standard interne, l'acide 15-hydroxy-éicosadiénoïque (15-HEDE).

### **2.5. Analyse des alcanes dans l'espace de tête des flacons de culture des semences**

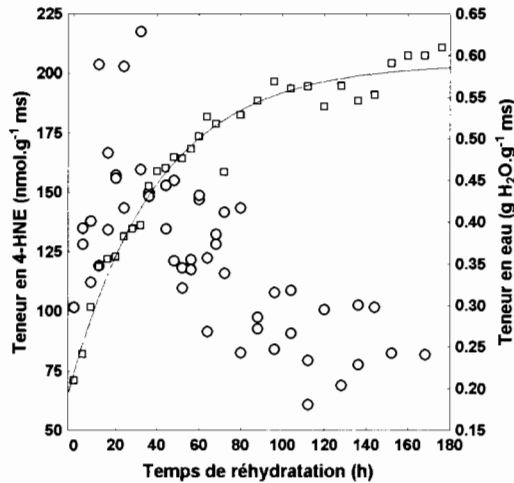
Au cours des 10 premiers jours de culture en conditions de germination, des semences ont régulièrement été prélevées pour l'étude de leur production de pentane. Chaque semence analysée a été placée sur un tampon de cellulose (Sorbarod, France) imbibé d'eau ultra-pure préalablement introduit dans un flacon de 10 ml (Supelco, France) scellé à l'aide d'une capsule en aluminium munie d'un septum en silicone. Après 0, 4, 8 ou 24 h de culture dans le flacon scellé, 1 ml de l'espace de tête du flacon a été analysé par chromatographie en phase gazeuse. Les alcanes de 1 à 6 atomes de carbone et l'éthylène ont été séparés sur un chromatographe (Helwett Packard 6890) équipé avec une colonne capillaire CP-SilicaPlot (ChromPack, France). L'injecteur et le détecteur ont été maintenus respectivement à 200 °C et 225 °C. La température de la colonne a été programmée à 60 °C pendant 4 mn, avant d'être augmentée jusqu'à 120 °C à raison de 20 °C.min<sup>-1</sup> et enfin maintenue à 120 °C pendant 10 mn. Le gaz porteur était de l'hélium à 2 ml.min<sup>-1</sup>. La recherche des alcanes et l'identification de l'éthylène ont été réalisées avec des standard commerciaux (Supelco, France).

## **3. RÉSULTATS**

L'analyse de la composition en acides gras des lipides totaux des semences de *C. arabica* révèle que les deux acides gras susceptibles d'être peroxydés au cours d'un stress oxydatif sont l'acide linoléique (C18:2), qui représente

représente 35 % des acides gras, et l'acide linoléique (C18:3) qui ne représente que 1 % des acides gras. La connaissance de la cible majoritaire d'une attaque oxydative chez les semences de *C. arabica*, l'acide linoléique, a permis d'identifier le 4-HNE [14] et le pentane [6] comme étant des marqueurs potentiels de la peroxydation des lipides chez ces semences.

Une augmentation de la teneur en 4-HNE des semences déshydratées et exposées à l'azote liquide jusqu'à des valeurs d'environ 200 nmol.g<sup>-1</sup> ms a été observée au cours des 32 premières heures de réhydratation (Figure 1).



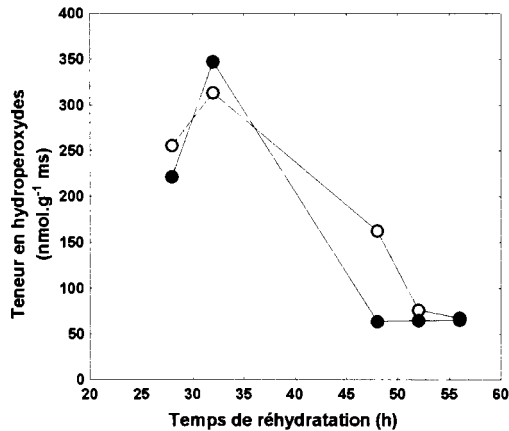
**Figure 1 :** Évolution de la teneur en eau (□) et de la teneur en 4-HNE (○) de semences de *C. arabica* déshydratées et exposées à l'azote liquide au cours de leur culture en conditions de germination. Chaque point correspond à la teneur en eau moyenne de deux semences ou à la teneur en 4-HNE d'une semence. Les données de teneur en eau ont été ajustées par un modèle exponentiel.

Au cours de cette période, la teneur en eau des semences augmente de 0,21 jusqu'à 0,40 g H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> ms. Entre 32 et 180 heures de réhydratation, la teneur en 4-HNE des semences cryoconservées diminue progressivement jusqu'à 50 nmol.g<sup>-1</sup> ms environ (figure 1). Une évolution similaire de la teneur en 4-HNE au cours de la réhydratation a été observée chez les semences uniquement déshydratées (tableau I). De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les semences cryoconservées et les semences témoins pour leur teneur en 4-HNE après 0, 24, 48, 72, 96 ou 120 h de réhydratation (Tableau I).

**Tableau I :** Teneur en 4-HNE ( $\text{nmol.g}^{-1} \text{ms}$ ) de semences de *C. arabica* déshydratées ou déshydratées et exposées à l'azote liquide après 0, 24, 48, 72, 96 et 120 h de réhydratation en conditions de germination. Résultats des analyses de variance : *F* et *P*.

	Temps de réhydratation (h)					
	0	24	48	72	96	120
Semences déshydratées	120,2	168,9	138,2	128,7	99,8	83,1
Semences déshydratées et exposées à l'azote liquide	102,3	154,9	143,9	130,3	96,1	80,4
<i>F</i>	4,921	0,679	0,089	0,015	0,063	0,030
<i>P</i>	0,157	0,442	0,794	0,913	0,825	0,870

La teneur en hydroperoxydes totaux des semences au cours de leur réhydratation suit une évolution de même nature que celle observée pour le 4-HNE (Figure 2) : une augmentation entre 28 et 32 heures de culture, suivie par une forte diminution jusqu'à environ  $60 \text{ nmol.g}^{-1} \text{ms}$  après 56 h de culture.



**Figure 2 :** Évolution de la teneur en hydroperoxydes totaux de semences de *C. arabica* déshydratées (O) ou déshydratées et exposées à l'azote liquide (●) au cours de leur culture en conditions de germination. Chaque point correspond à la teneur en hydroperoxydes de dix semences.

De plus, comme pour la teneur en 4-HNE, aucune différence significative ( $P > 0,05$ ) n'a été observée entre les semences témoins et les semences cryoconservées pour l'évolution de la teneur en hydroperoxydes totaux au cours de la réhydratation.

L'analyse de la composition en hydroperoxydes dans les semences montre, d'une part, que les mêmes hydroperoxydes ont pu être identifiés chez les semences déshydratées et les semences déshydratées et exposées à l'azote liquide et, d'autre part, que chaque hydroperoxyde identifié est en proportion égale chez les semences témoins et les semences cryoconservées (tableau II). Par ailleurs, dans toutes les semences analysées, les 9-HPODE et 13-HPODE sont apparus être en proportion équivalente.



Une production d'éthylène faible et constante a pu être détectée dans l'espace de tête des flacons de culture des semences témoins comme des semences cryoconservées (données non montrées). En revanche, aucune production d'alcanes n'a pu être détectée, quelque soit le traitement subi par les semences.

**Tableau II** : Composition (%) en acides hydroperoxy-octadécadiénoïques (HPODE) et hydroperoxy-octadécatriénoïques (HPOTE) des hydroperoxydes totaux extraits de semences de *C. arabica* déshydratées ou déshydratées et exposées à l'azote liquide. Résultats de l'analyse de variance : *F* et *P*.

	Hydroperoxydes (%)				
	9-HPODE	13-HPODE	12-HPOTE	13-HPOTE	16-HPOTE
Semences déshydratées	40,1	55,0	1,5	2,5	0,9
Semences déshydratées et exposées à l'azote liquide	43,8	50,9	1,2	2,0	2,1
<i>F</i>	0,96	1,00	0,06	0,10	2,18
<i>P</i>	0,35	0,34	0,81	0,75	0,17

#### 4. DISCUSSION

Ces travaux étaient axés sur la recherche des mécanismes physiologiques impliqués dans la sensibilité des semences de *C. arabica* à une exposition aux très basses températures. Ils ont permis de mettre en évidence que la perte de viabilité des semences de *C. arabica*, lorsqu'elles sont immergées dans l'azote liquide et réhydratées rapidement (de manière non contrôlée), n'est pas directement associée à un accroissement du niveau d'oxydation de leurs lipides. En effet, tant l'analyse quantitative et qualitative des hydroperoxydes que l'analyse quantitative du 4-HNE montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les semences déshydratées et les semences déshydratées et exposées à l'azote liquide pour le niveau d'oxydation de leurs lipides. À la différence des semences de *C. arabica*, chez de nombreux tissus et organismes végétaux, il a été montré que la sensibilité à une exposition à l'azote liquide était associée à un stress oxydatif prenant place dans les premières heures ou les premiers jours de culture suivant leur réchauffement. Une augmentation de la teneur en MDA a par exemple été observée dans des suspensions cellulaires de riz [4], des filaments de l'algue *Vaucheria sessilis* [16] et des embryons zygotiques de *Zizania palustris* [21] après un cycle de congélation/réchauffement. Il a également été montré qu'une exposition à l'azote liquide de cellules de carotte se traduit par un accroissement de la production de pentane au cours des premiers jours suivant leur réchauffement [3]. Il convient de s'interroger sur l'origine de cette différence entre ces quatre matériels végétaux et les semences de *C. arabica* pour l'implication d'un stress

oxydatif sur la perte de viabilité après réchauffement. Il peut être envisagé que cette différence soit due à une différence de niveau d'hydratation au moment de l'exposition à l'azote liquide. En effet, à la différence des semences de *C. arabica* qui ont été exposées à l'azote liquide à un niveau hydrique auquel l'activité respiratoire est arrêtée [24], les niveaux d'hydratation élevés auxquels les suspensions cellulaires de riz et de carotte, les filaments de *Vaucheria sessilis* et embryons zygotiques de *Zizania palustris* ont été cryoconservés permettent une reprise de l'activité respiratoire immédiatement après le réchauffement et, donc éventuellement, une surproduction de formes réactives de l'oxygène si le fonctionnement des mitochondries a été altéré par une exposition aux très basses températures.

Si la sensibilité à une exposition à l'azote liquide des semences de *C. arabica* ne semble pas directement associée à un niveau supérieur de peroxydation des lipides, il apparaît néanmoins qu'un pic de peroxydation prend place au cours des premières heures de la réimbibition. L'analyse de la composition en hydroperoxydes donne les premiers éléments sur l'origine de cette peroxydation des lipides dans les semences de *C. arabica*. L'absence de 10- et 12-HODE permet d'écartier l'hypothèse d'une photo-oxydation. La présence en proportion égale de 9- et 13-HODE ne permet pas de déterminer l'origine autoxydative ou enzymatique de la peroxydation des lipides observée [5], [20]. Néanmoins, les hydroperoxydes 12- et 16-HOTE, qui ne peuvent provenir que d'une peroxydation initiée par des radicaux libres, ne représentent que 3 % des hydroperoxydes détectés. De plus, l'évolution de la teneur en hydroperoxydes totaux observée au cours de la réimbibition des semences de *C. arabica* est tout à fait conforme à celle observée chez certaines semences oléagineuses pour lesquelles l'oxydation enzymatique des lipides est une des étapes nécessaires à la mobilisation des réserves lipidiques pour la germination [15]. L'analyse chirale des hydroperoxydes pourrait permettre de conclure à une origine enzymatique ou auto-oxydative de la peroxydation des lipides observée dans cette étude [5], [20]. L'étude de la peroxydation des lipides au cours de la réhydratation de semences de *C. arabica* non déshydratées apporterait aussi de précieuses informations sur le rôle possible de la peroxydation des lipides pour la mobilisation des réserves lipidiques au cours de la germination des semences de cette espèce. De plus, les analyses ayant été réalisées au niveau des lipides totaux des semences (majoritairement des lipides de réserve), si les caféiers font partie des espèces pour lesquelles la dégradation des lipides de réserve au cours de la germination doit être initiée par une oxydation enzymatique, il est tout à fait possible que le pic de peroxydation observé masque une attaque autoxydative des lipides membranaires associée à la cryoconservation. Il conviendrait donc de compléter cette étude par une analyse du rôle de la peroxydation des phospholipides membranaires dans la sensibilité à la cryoconservation des semences de *C. arabica*.

D'un point de vue méthodologique, ces travaux auront permis de montrer l'importance de l'analyse préalable de la composition en acides gras des tissus étudiés pour la mise en évidence d'un stress oxydatif. À notre connaissance, cette étude est la première à utiliser le 4-HNE comme marqueur de la peroxydation des lipides chez les semences. Au regard de la similitude des évolutions des teneurs en hydroperoxydes totaux et en 4-HNE dans les semences de *C. arabica* au cours de leur culture, le 4-HNE se révèle être un excellent marqueur de la peroxydation des lipides chez cette espèce. En revanche, le pentane, qui n'a pas pu être détecté dans l'espace de tête des flacons de culture des semences, apparaît être un mauvais marqueur de la peroxydation des lipides chez les semences de cette espèce. Ceci peut facilement être expliqué par le fait que, à la différence des organismes animaux, la  $\beta$ -scission des chaînes hydrocarbonées des hydroperoxydes conduisant à la formation d'alcane ne peut se faire sans un apport d'énergie thermique [6].

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés avec un soutien du Bureau des Ressources Génétiques (Paris, France). Les auteurs remercient vivement François Anthony pour la fourniture du lot de semences et Erica Benson pour ses conseils quant aux techniques utilisées pour le dosage du 4-HNE.

## RÉFÉRENCES

- [1] Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Côme D., Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds, *Physiol. Plant.* 104 (1998) 646-652.
- [2] Becwar M.R., Stanwood P.C., Lehnardt K.W., Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108 (1983) 613-618.
- [3] Benson E.E., Withers L.A., Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: a non-destructive method for assessing stability, *Cryo-Letters* 8 (1987) 35-46.
- [4] Benson E.E., Lynch P.T., Jones J., The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post-thaw survival. *Pl. Sci.* 85 (1992) 107-114.
- [5] Degoussé N., Triantaphylidès C., Montillet J.L., Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*), *Plant Physiol.* 104 (1994) 945-952.
- [6] Degoussé N., Triantaphylidès C., Starek S., Iacazio G., Martini D., Bladier C., Voisine R., Montillet J.L., Measurement of thermally produced volatile alkanes: an assay for plant hydroperoxy fatty acid evaluation, *Anal. Biochem.* 224 (1995) 524-531.

- [7] Dulloo E., Charrier A., Dussert S., Anthony F., Tesfaye S., Rakotomalala J.J., Agwanda C., Conservation of coffee genetic resources: constraints and opportunities. Proceedings of the 19th ASIC International Coffee Conference, Trieste, Italie, 2001. ASIC, Paris : CD-ROM.
- [8] Dussert S., Chabrillange N., Engelmann F., Anthony F., Hamon S., Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature, *Cryo-Letters* 18 (1997) 269-276.
- [9] Dussert S., Chabrillange N., Engelmann F., Hamon S., Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L., *Seed Sci. Res.* 9 (1999) 135-144.
- [10] Dussert S., Chabrillange N., Vasquez N., Engelmann F., Anthony F., Guyot A., Hamon S., Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica* L.) seeds, *Cryo-Letters* 21 (2000) 47-52.
- [11] Dussert S., Chabrillange N., Rocquelin G., Engelmann F., Lopez M., Hamon S., Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition and cooling procedure, *Physiol. Plant.* 112 (2001) 495-504.
- [12] Eira M.T.S., Walters C., Caldas L.S., Fazuoli L.C., Sampaio J.B., Dias M.C., Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature, *Rev. Brasil. Fisiol. Veg.* 11 (1999) 97-105.
- [13] Ellis R.H., Hong T.D., Roberts E.H., An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. *J. Exp. Bot.* 42 (1991) 653-657.
- [14] Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes, *Free rad biol med* 11 (1991) 81-128.
- [15] Feussner I., Kühn H., Wasternack C., Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids, *Trends in Pl. Sci.* 6 (2001) 268-273.
- [16] Fleck R.A., Day J.G., Clarke K.J., Benson E.E., Elucidation of the metabolic and structural basis for the cryopreservation recalcitrance of *Vaucheria sessilis*, *Cryo-Letters* 20 (1999) 271-282.
- [17] Fleck R.A., Benson E.E., Bremner D.H., Day J.G., Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular green alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxy radical assay: a novel approach for developing protistan cryopreservation strategies, *Free Rad. Res.* 32 (2000) 157-170.
- [18] Leprince O., Harren F.J.M., Buitink J., Alberda M., Hoekstra F.A., Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles, *Plant Physiol.* 112 (2000) 597-608.
- [19] Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L., Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57 (2002) 327-344.
- [20] Rustérucchi C., Montillet J.L., Agnel J.P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bes-soule J.J., Etienne P., Suty L., Blein J.P., Triantaphyllidès C., Involvement of lipoxygenase-dependant of fatty acid hydroperoxydes in the development of the hypersensitive cell death by cryptogein on tobacco leaves, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36446-36455.
- [21] Touchell D., Walters C., Recovery of embryos of *Zizania palustris* following exposure to liquid nitrogen, *Cryo-Letters* 21 (2000) 261-270.

- [22] Tully R.E., Musgrave M.E., Leopold A.C., The seed coat as a control of imbibitional chilling injury, *Crop Sci.* 21 (1981) 312-317.
- [23] Van der Vossen H.A.M., Methods of preserving the viability of coffee seed in storage, *Ken. Coffee* 45 (1977) 31-35.
- [24] Vertucci C.W., Farrant J.M., Acquisition and loss of desiccation tolerance. Kigel J., Galili G., (Eds), *Seed development and germination*, New York, Marcel Dekker Inc. (1995) pp.237-271.
- [25] Woodstock L.W., Tao K.L.J., Prevention of imbibition injury in low vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake, *Physiol. plant.* 51 (1981) 133-139.

# 4<sup>E</sup> COLLOQUE NATIONAL

## Le patrimoine génétique : la diversité et la ressource

La Châtre, 14 - 15 - 16 octobre 2002



BUREAU DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES



urgb

UNION POUR LES RESSOURCES  
GÉNÉTIQUES DE L'EUROPE



LIBERTÉ - ÉGALITÉ - FRATERNITÉ  
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE  
DE LA JEUNESSE,  
DE L'ÉDUCATION  
NATIONALE  
ET DE LA RECHERCHE

MINISTÈRE  
DE L'ÉCONOMIE,  
DES FINANCES  
ET DE L'INDUSTRIE

MINISTÈRE  
DE L'AGRICULTURE,  
DE L'ALIMENTATION,  
DE LA PÊCHE  
ET DES AFFAIRES RURALES

MINISTÈRE  
DE L'ÉCOLOGIE  
ET DU  
DÉVELOPPEMENT DURABLE

MINISTÈRE  
DE L'OUTRE-MER

MINISTÈRE  
DES AFFAIRES  
ÉTRANGÈRES



CENTRE NATIONAL  
DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



Les Actes

4<sup>e</sup> Colloque National BRG –  
Union des Ressources Génétiques  
du Berry

LE PATRIMOINE GÉNÉTIQUE :  
LA DIVERSITÉ ET LA RESSOURCE

*GENETIC INHERITANCE:  
THE DIVERSITY AND THE RESOURCE*

Les Actes du



n°4

### **Comité de lecture** (*Editorial board*)

Christophe BAILLY, Jacques BALANDREAU, Jacques BLONDEL, François BOILLOT, Patrick BOIRON, Gérard BOLET, François BONHOMME, Pierre BOUDRY, Jacques CABARET, Gilles CHARPIGNY, André CHARRIER, Claude COMBES, Jean-Marie CORNUET, Bernard COUDURIER, Marie-Josée DABOUSSI, Michel DESPREZ, Michel FONS, Françoise FRIDLANSKY, Jean-Jacques GODON, Katayoun GOUDARZY, Henriette GOYEAU, Pierrick HAFFRAY, Jean-Pierre HENRY, Geneviève HUMBERT, Thierry JOLY, Claire LAVIGNE, François LEFÈVRE, Corinne LEYVAL, Anne LUXEREAU, Jean-Leu MARCHAND, Philippe MARCHENAY, Francis MARTIN, Jean-Paul MIALOT, Martine MITTEAU, Jean-Claude MOCQUOT, Jean-Claude MOUNOLOU, Jean-Loup NOTTEGHEM, Patrick OLLITRAULT, Louis OLLIVIER, Dominique PLANCHENAUT, Jean-Paul RENARD, François RODOLPHE, Joëlle RONFORT, Pierre SAUMITOU-LAPRADE, Joseph SCHREVEL, Laurent SUTRA, Irène TILL-BOTRAUD, Maxime TROTTET, Gilles TROUCHE, Etienne VERRIER, Alain ZACHOWSKI.

### **Comité éditorial** (*Editorial secretary*)

Valérie BRENUGAT, Françoise FRIDLANSKY, Frédérique MARIE et Martine MITTEAU.

### **Mise en page**

Frédérique MARIE.

### **Remerciements**

Les travaux ont été réalisés avec le soutien des ministères en charge respectivement de la Recherche, de l'Agriculture et de l'Environnement, de l'INRA, de l'IRD et du CIRAD.

Le colloque a bénéficié du concours financier du CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), du Conseil Général de l'Indre, du Conseil Général du Cher, du Conseil Régional du Centre, de la DIREN Centre, du GEVES (Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences), de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) [Direction « Plante et Produits du Végétal », Départements de Génétique animale, de Microbiologie, de Génétique et Amélioration des Plantes, de l'IRD (Institut de recherche pour le développement), de la Mairie de La Châtre, du Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales, du Ministère de l'Écologie et du Développement Durable, de la SICASOV (Société coopérative d'intérêt collectif agricole anonyme des obtenteurs des variétés végétales).