



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES EN
SCIENCES DE LA VIE

OPTION: BIOTECHNOLOGIE ET MICROBIOLOGIE

**METABOLITES SECONDAIRES PARTICULIERS
DES FEUILLES DE CINQ POPULATIONS DE MASCAROCOFFEA
ET DES ENDOPHYTES DES FEUILLES DE *Coffea sp A315***

Présenté par:

ANDRIAMIALIHARISOA Ravaka Fanoharantsoa

Maître ès sciences

Soutenu le 29 juillet 2011 devant la Commission d'Examen composée de:

Président: Pr. ANDRIANARISOA Blandine
Examineurs: Pr. RAHERIMANDIMBY Marson
Dr. RANDRIANIERENANA Ando
Rapporteurs: Dr. RAKOTOMALALA Jean Jacques
Dr. RAMAMONJISOA Daniel



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES EN
SCIENCES DE LA VIE

OPTION: BIOTECHNOLOGIE ET MICROBIOLOGIE

METABOLITES SECONDAIRES PARTICULIERS
DES FEUILLES DE CINQ POPULATIONS DE MASCAROCOFFEA
ET DES ENDOPHYTES DES FEUILLES DE *Coffea sp A315*

Présenté par:

ANDRIAMIALIHARISOA Ravaka Fanoharantsoa

Maître ès sciences

Soutenu le 29 juillet 2011 devant la Commission d'Examen composée de:

Président:	Pr. ANDRIANARISOA Blandine
Examineurs:	Pr. RAHERIMANDIMBY Marson Dr. RANDRIANIERENANA Ando
Rapporteurs:	Dr. RAKOTOMALALA Jean Jacques Dr. RAMAMONJISOA Daniel

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à notre collaboration avec, le laboratoire du DRA-FOFIFA à Ambatobe, le laboratoire de Biochimie du DBFA à Ankatso et le laboratoire de Microbiologie de l'Unité de Biodiversité de l'IMRA à Avarabohitra-Itaosy.

Qu'il nous soit permis d'adresser nos reconnaissances et notre gratitude,

A Madame ANDRIANARISOA Blandine Président de Jury,

Professeur Titulaire au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Malgré vos multiples tâches, vous nous avez fait l'insigne honneur de présider ce jury.

A nos examinateurs :

Monsieur RAHERIMANDIMBY Marson,

Professeur Titulaire au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Madame RANDRIANIERENANA Ando,

Maître de Conférences au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Qui ont accepté avec bonne volonté d'être parmi les membres de jury de ce mémoire.

A nos rapporteurs :

Monsieur RAKOTOMALALA Jean Jacques,

Maître de Recherches au Département de Recherches Agronomiques du FOFIFA Ambatobe. Vous êtes à l'origine de ce travail. Nous ne saurions vous remercier pour votre accueil au sein de votre équipe. Vous n'avez épargné ni votre temps ni vos conseils malgré vos lourdes tâches. Monsieur, nous vous devons une profonde reconnaissance.

Monsieur RAMAMONJISOA Daniel,

Maître de Conférences au Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. Vous n'avez ménagé ni votre temps, ni votre peine pour que ce mémoire puisse être réalisé. Veuillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance.

Madame RAKOTO Danielle Aurore Doll,
Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des sciences,
Université d'Antananarivo, qui nous a donné l'autorisation à travailler dans le laboratoire du
DBFA pendant les jours ouvrables et week-end voir la nuit. Veuillez trouver ici l'expression
de notre profonde reconnaissance.

Monsieur RABEMANANTSOA Christian,
Chef du Département de la Biodiversité de l'IMRA, qui nous a accueilli dans son laboratoire
de Microbiologie, qui n'a pas épargné ses conseils malgré ses lourdes tâches. Permettez-nous
de vous exprimer nos reconnaissances les plus sincères.

Monsieur RAJAONARIVELO Jacob,
Spécialiste en Biotechnologie et Microbiologie, Responsable du laboratoire de Microbiologie
à l'IMRA qui n'a pas ménagé ni son temps, ni ses efforts, ni ses conseils à la réalisation de ce
travail. Vous nous avez transmis vos connaissances. Veuillez trouver ici le témoignage de
notre sincère reconnaissance.

Monsieur RABEMIAFARA Alfred,
Directeur de la station de collection des *Mascarocoffea* du FOFIFA à Kianjavato qui nous a
fourni des aides matériels indispensables. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde
reconnaissance.

Monsieur RAKOTONDRAVAO Arsène,
Directeur de la station de recherche régionale Est du FOFIFA à Ilaka-est qui n'a pas épargné
ni son temps ni ses conseils à la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de
notre sincère reconnaissance.

Nos reconnaissances vont également,

A toutes les équipes du FOFIFA, à Tanjona, Njakarinala, José et à tous les
étudiants stagiaires.

A toute ma famille,

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont apporté leur pierre à la réalisation de ce
mémoire.

Sommaire

Glossaire.....	i
Abréviations	ii
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	v
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I ETUDE DES METABOLITES SECONDAIRES SPECIFIQUES DES CAFEIERS DU GROUPE DE <i>Coffea sp A 315</i>	4
I-A ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I-A-1 DESCRIPTION DES PLANTES UTILISEES	4
I-A-1-1 LES CAFEIERS	4
I-A-1-1-1 Position systématique	4
I-A-1-1-2 Répartition géographique des espèces	5
I-A-1-1-3 Les <i>Mascarocoffea</i>	6
I-A-1-1-4 La série <i>Multiflorae</i>	6
I-A-1-2 LE MELILOT JAUNE	8
I-A-2 ETUDE DES SUBSTANCES CHIMIQUES CIBLEES.....	9
I-A-2-1 LE MELILOTOSIDE	9
I-A-2-1-1 Biosynthèse de la coumarine	10
I-A-2-1-2 Utilisation pharmacologique.....	11
I-A-2-2 LES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES.....	11
I-A-2-2-1 L'acide <i>p</i> -coumarique	11
I-A-2-2-2 L'acide <i>o</i> -coumarique	11
I-A-2-2-3 L'acide caféique	12
I-A-2-2-4 L'acide férulique	12
I-A-2-2-5 L'acide sinapique	13
I-A-2-2-6 Les acides méthoxycinnamiques	13
I-A-2-3 LES ACIDES CHLOROGENIQUES	14
I-A-2-3-1 L'acide caféoyl-5-quinique.....	15
I-A-2-3-2 Les acides féruloylquiniques	16
I-A-2-3-3 Les acides dicaféoylquiniques	16
I-A-2-4 LA TRIGONELLINE.....	17
I-A-2-5 LA CAFEINE.....	17

I-B	MATERIELS ET METHODES.....	18
I-B-1	MATERIELS	18
I-B-1-1	MATERIEL VEGETAL	18
I-B-1-1-1	La station de Kianjavato	18
I-B-1-1-2	Présentation des échantillons à étudier	18
I-B-1-1-3	Répartition des feuilles en lots.....	20
I-B-1-2	LES SUBSTANCES DE REFERENCE	20
I-B-2	METHODES.....	21
I-B-2-1	PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL	21
I-B-2-2	EXTRACTION.....	21
I-B-2-3	PURIFICATION PARTIELLE	21
I-B-2-4	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	23
I-B-2-4-1	Principe	23
I-B-2-4-2	Mode opératoire	23
I-C	RESULTATS ET DISCUSSION.....	25
I-C-1	CHROMATOGRAPHIE PREPARATOIRE.....	25
I-C-2	CHROMATOGRAMME, solvant Méthylisobutycétone-acide Formique-Eau .	25
I-C-3	CHROMATOGRAMME, solvant Butanol-Ammoniac	28
I-D	CONCLUSIONS.....	31
CHAPITRE II	ETUDE DES MICROORGANISMES ENDOPHYTES DES	
	FEUILLES DE <i>Coffea sp A 315</i>	33
	INTRODUCTION.....	33
II-A	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	33
II-A-1	DEFINITION	33
II-A-2	MODE DE TRANSMISSION	33
II-A-3	INTERACTION ENTRE PLANTES ET ENDOPHYTES	34
II-A-3-1	STATUT D'EQUILIBRE PLANTE-ENDOPHYTE.....	34
II-A-3-1-1	Le commensalisme	34
II-A-3-1-2	Le mutualisme.....	34
II-A-3-2	QUELQUES AVANTAGES.....	35
II-A-4	ILLUSTRATION D'UNE COLONISATION PAR UN CHAMPIGNON	
	ENDOPHYTE.....	36

II-B	MATERIELS ET METHODES.....	37
II-B-1	MATERIELS	37
II-B-1-1	MATERIEL VEGETAL	37
II-B-1-1-1	Pépinière des caféiers.....	37
II-B-1-1-2	Culture de caféiers par semis	37
II-B-1-1-3	Bouturage.....	38
II-B-1-2	MILIEUX DE CULTURE.....	38
II-B-2	METHODES	38
II-B-2-1	PREPARATION DES FEUILLES.....	38
II-B-2-1-1	Prélèvement des feuilles	38
II-B-2-1-2	Désinfection en surface.....	38
II-B-2-1-3	Vérification du procédé de désinfection en surface.....	39
II-B-2-2	CULTURES MICROBIENNES	40
II-B-2-2-1	Mise en culture.....	40
II-B-2-2-2	Isolement.....	40
II-B-2-2-3	Purification.....	40
II-B-2-2-4	Dénombrement des colonies.....	41
II-B-2-3	IDENTIFICATION	41
II-B-2-3-1	Identification des bactéries	41
II-B-2-3-1-1	Observation macroscopique.....	41
II-B-2-3-1-2	Observation microscopique	41
II-B-2-3-1-3	Test biochimique	42
II-B-2-3-2	Identification des champignons	44
II-B-2-3-2-1	Observation macroscopique.....	44
II-B-2-3-2-2	Observation microscopique	45
II-B-2-4	CONSERVATION	45
II-B-2-4-1	Conservation des bactéries.....	45
II-B-2-4-2	Conservation des champignons	45
II-B-2-5	CULTURE FERMENTATIVE	46
II-B-2-5-1	Fermentation bactérienne.....	46
II-B-2-5-1-1	Cinétique de croissance bactérienne	46
II-B-2-5-1-2	Processus de la fermentation bactérienne	47
II-B-2-5-2	Fermentation fongique.....	48

II-B-2-6	EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES DES MICRO-ORGANISMES ENDOPHYTES DE FEUILLES DE <i>C. sp A315</i>	48
II-B-2-7	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	49
II-C	RESULTATS ET DISCUSSION.....	50
II-C-1	LES BACTERIES ENDOPHYTES	50
II-C-1-1	DENOMBREMENT DE COLONISATION	50
II-C-1-2	OBSERVATION MORPHOCULTURALE	51
II-C-1-3	TESTS BIOCHIMIQUES	51
II-C-1-4	CINETIQUES DE CROISSANCE	52
II-C-2	LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES	53
II-C-2-1	OBSERVATION MACROSCOPIQUE ET DENOMBREMENT	53
II-C-2-2	IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES	55
II-C-3	LES METABOLITES SECONDAIRES.....	55
II-C-3-1	CROISSANCE ET FERMENTATION	55
II-C-3-2	CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE CHAMPIGNON.....	56
II-C-3-3	CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DES BACTERIES.....	57
II-D	CONCLUSIONS.....	59
II-E	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	61
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63
	ANNEXES.....	69

Glossaire

5-désoxy-strigol : substance de reconnaissance entre les champignons endophytes et la plante hôte (sesquiterpène), isolée lors de la pénétration d'hyphes après la germination d'une spore.

Appressorium (ou appressoria): Organe de fixation et de pénétration des champignons dans les plantes.

Chlamyospore : Cellule à paroi épaisse (forme de résistance) chez les champignons.

Conidie: Spore asexuée formée à l'extrémité d'un conidiophore.

Conidiophore: Structure végétative produite par l'hyphes et portant les conidies.

Endophyte: Organisme vivant à l'intérieur d'un végétal sans être, généralement, pathogène.

Epiphytes: Ce sont des parasites implantés sur les parties aériennes de leur hôte.

Groupe de *Coffea sp A315*: Constitué par les cinq populations spontanées des *Mascarocoffea* dont *C. sp A315*, *C. sp A311*, *C. A525*, *C. A227* et *C. A808*.

Mascarocoffea: Caféiers spontanés de la région Malgache (Madagascar, îles de Mascareignes et Comores).

Métilotoside: C'est un glycoside de l'acide *o*-coumarique, trouvé chez *Melilotus officinalis*.

Métabolites secondaires: ce sont de substances biologiques produites par les organismes vivants. Ils ne participent pas directement au fonctionnement cellulaire et au développement de la plante.

Nécrose: Altération résultant de la mort des cellules.

Parties asymptomatiques: Une partie d'organe des plantes apparemment saine.

Pycnide: Fructification globuleuse ouverte par un ostiole chez les Deutéromycètes.

Saprophyte: Organisme qui se nourrit de matière organique morte.

Abréviations

AC3Q	Acide caféoyl-3-quinique	p-cou	Acide <i>p</i> -coumarique
AC4Q	Acide caféoyl-5-quinique	PDA	Potato Dextrose Agar
AC5Q	Acide caféoyl-5-quinique	PDB	Potato Dextrose Broth
Alk	Alcaloïdes	Qsp	quantité suffisante pour
ARA	<i>Coffea arabica</i>	Rf	Référence frontale
BA	Butanol-ammoniac	sp	Spontané
CAF	Caféine	TRG	Trigonelline
CAN	<i>Coffea canephora</i>	UFC	Unité Formant Colonie
CCM	Chromatographie sur couche mince	UV	Ultraviolet
Cou	Coumarine	V/V	Volume à volume
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse		
Di-M	Acide diméthoxycinnamique		
DG	Diterpènes glycosidiques		
Fer	Acide férulique		
HPLC	High Performance Liquid Chromatography		
M	Métilotoside		
Mcf	Mc Farland		
MFE	Méthylisobutylcétone-acide Formique-Eau		
NA	Nutrient Agar		
NB	Nutrient Broth		
O-cou	Acide <i>o</i> -coumarique		

Liste des figures

Figure 1:	Distribution géographique du genre <i>Coffea</i> , sous-genre <i>Coffea</i>	5
Figure 2:	Présentation des <i>Mascarocoffea</i> étudiés.....	7
Figure 3:	<i>Melilotus officinalis</i> ou Mélilot jaune	8
Figure 4:	Ménilotoside	9
Figure 5:	Biosynthèse de la coumarine	10
Figure 6:	Structures des acides hydroxycinnamiques	13
Figure 7:	Configuration spatiale de l'acide quinique	15
Figure 8:	Quelques isomères des acides chlorogéniques	16
Figure 9:	(A) Trigonelline, (B) Caféine	17
Figure10:	Carte de représentation de la station de collection	19
Figure11:	Schéma récapitulatif de l'extraction des métabolites secondaires des feuilles	22
Figure 12:	Chromatogramme des extraits des feuilles de <i>Coffea</i> A227, A311, A315, A525, A808 sous UV à 254 nm, solvant méthylisobutylcétone-acide formique-eau.....	25
Figure 13:	Chromatogramme des extraits des feuilles de <i>Coffea</i> A227, A311, A315, A525, A808 sous UV à 360 nm, solvant méthylisobutylcétone-acide formique-eau	25
Figure 14:	Chromatogramme des extraits hydroalcooliques des populations de <i>Coffea</i> A315, A311, A227, A525 et A808 sous UV à 254 nm, solvant butanol- ammoniac	28
Figure 15:	Chromatogramme des extraits hydroalcooliques des populations de <i>Coffea</i> A315, A311, A227, A525 et A808 sous UV à 360 nm, solvant butanol- ammoniac.....	28
Figure 16:	Développement symbiotique d'endophytes fongiques	36

Figure 17: Pépinière des caféiers	37
Figure 18: Manipulation sous hotte à flux laminaire	39
Figure 19: Comportement bactérien vis-à-vis de l'oxygène	43
Figure 20: Appareillage de suivi de la cinétique de croissance bactérienne	47
Figure 21: Courbe de croissance bactérienne et ses différentes phases	47
Figure 22: Schéma récapitulatif de l'extraction des métabolites secondaires des microorganismes endophytes	49
Figure 23: Cinétiques de croissance des bactéries, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 et B8.	52
Figure 24: Champignons endophytes de feuille de <i>C. sp A315</i>	55
Figure 25: Chromatogramme des extraits de la fermentation fongique à 254 nm, solvant méthylisobutylcétone-acide formique-eau	56
Figure 26: Chromatogramme des extraits de la fermentation fongique à 360 nm, solvant méthylisobutylcétone-acide formique-eau	56
Figure 27: Chromatogrammes des extraits de bactéries endophytes de <i>C. sp A315</i> sous UV (A) à 254 nm et (B) à 360 nm	57

Liste des tableaux

Tableau 1: Présentation des échantillons végétaux	18
Tableau 2: Profils des extraits aqueux des feuilles en chromatographie sur couche mince, solvant Méthylisobutylcétone-acide Formique-Eau	27
Tableau 3: Profils des extraits aqueux des feuilles en chromatographie sur couche mince, solvant Butanol-Ammoniac	29
Tableau 4: Dénombrement des bactéries endophytes	50
Tableau 5: Observations macroscopiques et microscopiques des bactéries	51
Tableau 6: Tests biochimiques	51
Tableau 7: Observation macroscopique des champignons et dénombrement	54

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le café est aujourd'hui le deuxième produit d'exportation mondiale après le pétrole. Environ 6 millions de tonnes sont produites annuellement par plus de 70 pays de la zone intertropicale. Les principaux producteurs sont le Brésil, la Colombie, le Vietnam et la Côte d'Ivoire. Deux espèces seulement sont à l'origine de cette production: *Coffea arabica*, espèce tétraploïde, cultivée sur les plateaux d'Afrique et d'Amérique du Sud, en assure 68%. Son café, aromatique et peu amer, est le plus apprécié des consommateurs. La seconde espèce, *Coffea canephora* (ou *Robusta*) représentant 90% de la production nationale de Madagascar, est cultivée à peu près partout.

Les *Mascarocoffea*, terme créé par CHEVALIER en 1938, englobant les caféiers spontanés de Madagascar et des îles voisines, sont les plus riches en taxons. Si le sous-genre *Coffea* compte 103 espèces décrites (DAVIS et al., 2006), 57 espèces appartiennent à la section *Mascarocoffea* dont 4 espèces se trouvent aux Iles Mascareignes tandis que 55 espèces sont endémiques des forêts tropicales de Madagascar. Ils sont différents des caféiers cultivés par leurs caractères morphologiques, physiologiques, phénologiques, agronomiques et biochimiques. Ils se sont adaptés dans divers climats allant du type humide de l'est à celui aride et sec du sud. Ils ont évolué au cours des temps géologiques, en subissant divers facteurs de sélection attribuables aux variations des microclimats de leur habitat ainsi que des agressions d'autres organismes qui y cohabitent.

Ces caféiers sont rassemblés et préservés dans la station de recherche et de collection *ex-situ* appartenant au FOFIFA (Foibem-pirenena momba ny Fikarohana ampiharina amin'ny Fampanandrosoana ny Ambanivohitra ou Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural) de Kianjavato. Les caféiers en collection font l'objet des recherches diverses. Par exemples on y pratique des études d'amélioration, de conservation et des caractères génétiques intéressants des *Mascarocoffea*. Actuellement, les études biochimiques et morphologiques sont les plus fréquentes. Des mis au point de la technique de la réadaptation de quelques espèces fragiles y sont aussi menés.

Les études faites sur les caféiers se sont presque concentrées sur les espèces cultivées tandis que celles des *Mascarocoffea* restent encore fragmentaires. Néanmoins, il a été confirmé que toutes les populations de cette section sont diploïdes (LOUARN, 1972), réputées sans caféine (CHARRIER. et BERTRAUD, 1975), exceptés *Coffea lancifolia* et *Coffea kianjavatensis* (CLIFFORD et al., 1991). En revanche ces deux taxons contiennent des alcaloïdes autres que la caféine telle que la théacrine, la théophylline et la théobromine. Les *Mascarocoffea* se caractérisent par des acides chlorogéniques (ACG) très diversifiés, allant de l'acide *p*-coumarique, l'acide *o*-coumarique, l'acide sinapique, en passant par les acides hydroxycinnamiques rares comme les acides di- et tri-méthoxycinnamiques. Le mélilotoside (glycoside de l'acide *o*-coumarique), composé insoupçonné et des mascarosides et cafamarine (diterpènes glycosidiques), y ont été aussi découverts. Ces diterpènes glycosidiques semblent être les responsables de l'amertume de ces cafés sauvages, selon RAKOTOMALALA (1992).

A notre connaissance, les études des métabolites secondaires caractéristiques des feuilles des *Mascarocoffea* n'ont pas été encore très détaillées. Or, les feuilles semblent être des bons matériels végétaux en tant que principaux organes de synthèse. Elles sont riches en métabolites secondaires, et disponibles pendant toutes les saisons de l'année.

Actuellement, l'extraction d'un métabolite secondaire d'une plante donnée est devenue indissociable à celles des microorganismes endophytes. A titre d'exemple, les asiaticoïdes de *Centella asiatica* ne sont produites que par l'intermédiaire de certains champignons endophytes (RAJAONARIVELO, 2006). Parallèlement, les endophytes des plantes tropicales sont moins étudiés, or, ce sont des sources des nouvelles molécules (Li et al., 2001). Ces concepts pourraient nous être utiles pour élucider l'existence de ces substances, dites rares dans le règne végétal, qu'on trouve dans les graines de quelques populations des *Mascarocoffea*. Chez la série *Multiflorae* les peuplements de *C. perrieri* (A12, A305, A421 et A724) sont caractérisés par leur contenu en dérivés di- et tri-méthoxycinnamiques ; tandis que *C. andrambovatensis* (*C.* A227) et d'autres taxons, dénommés groupe de *Coffea* sp A315 (A315, A311, A227, A525, A808), se singularisent par la présence de mélilotoside (RAKOTOMALALA et al., 1993).

Cependant, l'analyse préalable de ces métabolites secondaires des *Mascarocoffea* nécessite des moyens souvent coûteux surtout face au nombre important de matériel végétal à étudier. En outre, des appareillages modernes comme HPLC, CPG, spectre d'absorption, spectre de masse etc...sont nécessaires. Dans le présent travail, une analyse simple et moins onéreuse est utilisée dont la CCM qualitative. Quelques substances standard disponibles tels que les acides, férulique, sinapique, caféique, chlorogénique, *o*- et *p*-coumarique ; trigonelline et la caféine sont utilisées.

Notre contribution consiste, à extraire les métabolites secondaires particuliers de feuilles de cinq populations de *Mascarocoffea* dénommées « *Groupe de Coffea sp A315* » et à comparer avec ceux des graines. Le mélilotoside, les acides chlorogéniques, les acides hydroxycinnamiques, la trigonelline, les diterpènes glycosidiques ainsi que la caféine seront à déterminer. Nous essayerons aussi d'isoler les microorganismes endophytes de feuilles de *C. sp A315* et d'en extraire les métabolites secondaires afin de déterminer si les molécules que renferment les feuilles de *C. sp A315* se retrouvent dans ces microorganismes endophytes.

Ce travail comprend deux chapitres. Dans le premier chapitre, nous présenterons les processus d'extraction et d'identification des métabolites secondaires des feuilles de cinq populations des *Mascarocoffea*. Le deuxième chapitre traitera l'étude des microorganismes endophytes des feuilles de *C. sp A315* et leurs métabolites secondaires.

CHAPITRE I

ETUDE DES METABOLITES SECONDAIRES SPECIFIQUES DES CAFEIERS DU GROUPE DE *Coffea sp.* A 315

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I ETUDE DES METABOLITES SECONDAIRES SPECIFIQUES
DES CAFEIERS DU GROUPE DE *Coffea sp* A 315

I-A ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I-A-1 DESCRIPTION DES PLANTES UTILISEES

I-A-1-1 LES CAFEIERS

Les caféiers sont tous originaires des forêts intertropicales d’Afrique, de Madagascar, de l’archipel des Comores et des Iles Mascareignes. Ce sont des arbres ou arbustes ; leurs tiges feuillées, alternes opposées, sont ligneuses. Les caféiers se distinguent par leur placentation dite “cafféenne”, leurs graines sont caractérisées par la présence d’un sillon, plus ou moins invaginé, dans la partie ventrale de l’albumen. Selon DAVIS et ses collaborateurs (2006), il en existe 103 espèces décrites tandis que d’autres sont encore en voix de description.

I-A-1-1-1 Position systématique

La systématique du caféier se présente comme suit:

<u>Règne:</u>	VEGETAL
<u>Embranchement:</u>	ANGIOSPERMES
<u>Classe:</u>	DICOTYLEDONES
<u>Ordre:</u>	GENTIANALES
<u>Famille:</u>	RUBIACEES
<u>Genre:</u>	<i>Coffea</i>

I-A-1-1-2 Répartition géographique des espèces

Les espèces du sous-genre *Coffea* se répartissent en trois grands ensembles biogéographiques (Fig. 1) séparés par le Canal du Mozambique et la dorsale du Kivu, à l'est du Zaïre (LE PIERRES, 1995):

- ⇒ La région malgache, comprenant Madagascar, les Iles Mascareignes et l'archipel des Comores, où l'on trouve notamment les *Mascarocoffea* : *C. lancifolia* Chevalier, *C. homollei* Leroy, *C. humblotiana* ...,
- ⇒ L'Afrique orientale, comprenant des zones hétérogènes de climat et d'altitude variées situées entre la dorsale Est-africaine et l'Océan Indien. L'Est abrite les *Mozambicoffea* (*C. pseudozanguebariae*, *C. sessiliflora*, *C. racemosa*) décrits par BRIDSON (1994) ;
- ⇒ L'Afrique centrale et occidentale allant de la façade Atlantique à la partie centrale du continent, jusqu'à la dorsale du rift où se rencontrent les *Eucoffea*, typiques des basses altitudes : *C. canephora*, *C. liberica*, *C. congensis*, et *C. arabica*.

Sur le continent, la distribution des espèces est inégale selon les régions. Les façades océaniques de l'Afrique centrale et de l'Afrique orientale semblent plus riches. A Madagascar, la diversité semble être extrême: plus de cinquante taxons ont été décrits alors qu'on n'en recense qu'une trentaine pour toute l'Afrique.

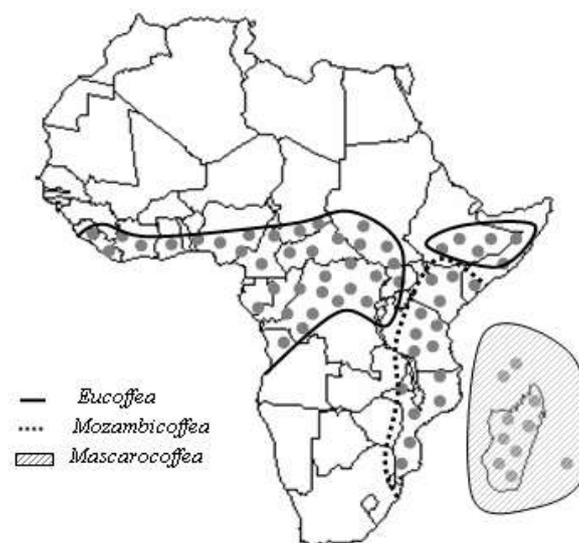


Figure 1: Distribution géographique du genre *Coffea*, sous-genre *Coffea* (D'après CHEVALIER 1938-1947)

I-A-1-1-3 Les *Mascarocoffea*

C'est une section qui regroupe les caféiers spontanés de Madagascar, des Iles Mascareignes et de l'archipel des Comores selon CHEVALIER (1942). Cette section est subdivisée, selon CHARRIER (1978) en six séries botaniques d'après leur comportement phénologique, leurs caractères morphologiques, agronomiques, technologiques, et leur comportement en inter-croisement. Ce sont les séries *Verae*, *Mauritianae-Humblotiana*, *Multiflorae*, *Millotii*, *Garcinoïdes* et *Subterminales*.

I-A-1-1-4 La série *Multiflorae*

Selon CHEVALIER (1947), la définition de la série *Multiflorae* repose sur les caractères morphologiques de *C. gallieni* (= *C. perrieri*) et de *C. resinosa* : caractérisées par des feuilles coriaces assez grandes (10-15 cm de longueur) à nervation fine et nette ; des inflorescences en position axillaire sur le bois âgé, constituées de fascicules nombreux ou de courtes cymes très florifères ; des fleurs de longueur de 8 à 12 mm, à tube court évasé et des fruits ovoïdes allongés (Fig. 2, E ; page 7).

Les populations de cette série sont caractérisées par des arbustes en forme de fuseau ou de cône ; exemple: *C. sp A311*, *C. A808*, *C. sp A315* et *C. 227* (Fig. 2 respectivement figures A, F, G et J, page 7). Cette série présente une grande diversité d'adaptations, altitudinales (0 à 1500 m), pédologique (sur sables blancs, sols ferrallitiques) et climatique (humide, tempéré, frais et sec).

Les populations de la série *Multiflorae* appartiennent aux différents territoires phytogéographiques de Madagascar, mais essentiellement à la région orientale. Ces populations naturelles relèvent d'une dizaine d'espèces décrites. Il n'est pas toujours aisé de les rattacher aux taxons connus car elles possèdent des caractères intermédiaires. Les principales populations étudiées en collection sont les suivantes : *A8* (*C. resinosa*), *A538* (*C. sahafaryensis*); *A403* (*C. arenasiana*), *A227* (*C. andrambovatensis*), *A573* (*C. betamponensis*), *A18* (*C. mangoroensis*), *A12*, *A305*, *A421* (*C. perrieri*), *A317*, *A321*, *A311*, *A315*, *A808* (*C. ankaranensis*), *A525*.



Figure 2: A, B et C représentent respectivement le pied, les feuilles et les fleurs de *C. A311* ; E: fruits de *C. A311* ; D et F représentent les fleurs et pied de *C. A808* ; G représente le pied de *C. A315* ; H, J et I sont respectivement les feuilles et le pied de *C. A227* et le pied de *C. A525*.
(Clichés Norosoa Razafinarivo)

I-A-1-2 LE MELILOT JAUNE

Melilotus officinalis est une plante riche en mélilotoside (glycoside de l'acide *o*-coumarique). Cette substance a été aussi aperçue dans les graines de *C. sp A315*, *C. sp A311*, *C. A227*, *C. A525* et *C. A808* par RAKOTOMALALA et ses collaborateurs, (1993). Faute de standard commercial du mélilotoside, *Melilotus officinalis* a été utilisé en tant que témoin pour mettre en évidence ce composé dans les feuilles de ces 5 populations de caféiers du groupe de *Coffea sp A315*.



Figure 3: *Melilotus officinalis* ou Mélilot jaune
(Source: Institut Européen des Substances Végétales)

Melilotus officinalis, appartenant à la famille des FABACEAE, est une plante bisannuelle des terrains calcaires ou légèrement salés, à racines fibreuses et blanches. Les tiges, de 0,5 à 1 mètre, portent des feuilles trifoliées. Les fleurs, jaunes, odorantes, visibles de mai à septembre, sont réunies en grappes allongées. Les fruits sont des gousses contenant des graines. Commun en Europe et en Asie tempérée, le mélilot pousse dans des endroits secs et pauvres et jusqu'à 2200 mètres d'altitude. Le mélilot est connu sous le nom de mélilot jaune, mélilot des champs, petit trèfle jaune, luzerne royale, pratelle, herbe aux mouches et couronne royale.

I-A-2 ETUDE DES SUBSTANCES CHIMIQUES CIBLEES

I-A-2-1 LE MELILOTOSIDE

Quelques taxons de la série *Multi-florae*, le groupe du *C. sp A315*: *C. andrambovatensis* (A227), *C. sp A315*, *C. sp A311*, *C. ankaranensis* (A525) et *C. ankaranensis* (A808), se singularisent par la présence de **mélilotoside** (Fig. 4), ou **acide *trans*-2- β -glucosyloxycinnamique**. C'est une substance identifiée par RAKOTOMALALA et ses collaborateurs, (1993) dans les *Mascarocoffea*. Elle se trouve normalement dans les plantes herbacées telles que les mélilots (*Melilotus officinalis* et *Melilotus alba*) (WICHTL et ANTON, 2003), mais aussi chez le *Dendrobium aurantiacum* var *denneanum* de la famille des orchidacées (YANG et *al.*, 2007).

Les tiges feuillées du mélilot jaune (Fig. 3) renferment du mélilotoside ainsi que de la mélilotine, de l'acide mélilotique et de l'acide melilotine-coumarique. Ces sont des dérivés coumariniques responsables de l'odeur (aromatique, agréable, doux) de l'herbe desséchée (WICHTL et ANTON, 2003). Le mélilotoside peut s'y rencontrer en quantité très élevée (2000mg·kg⁻¹ soit 0,2%).

Le mélilotoside s'accumule dans les vacuoles et subit une isomérisation *trans/cis* sous des activités photochimiques ou enzymatiques (MURRAY et *al.* 1982 ; MATERN et *al.*, 1988 ; BROWN et ZOBEL, 1990). Quand la cellule est détruite, pendant le séchage de la plante, le *cis*-glucoside est clivé, par une activité enzymatique, catalysée par la β -glycosidase cytosolique, en glucose et en acide *cis*-2-coumarique sous formes libres. Ce dernier va subir spontanément une lactonisation pour donner la coumarine (BRUNETON, 2009) (Cf. biosynthèse de la coumarine fig. 5, page 10)

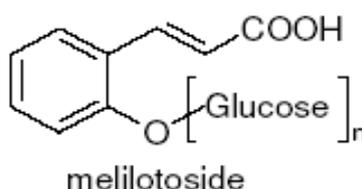


Figure 4: Mélilotoside (source : www.croupwhacth.org)

I-A-2-1-1 Biosynthèse de la coumarine

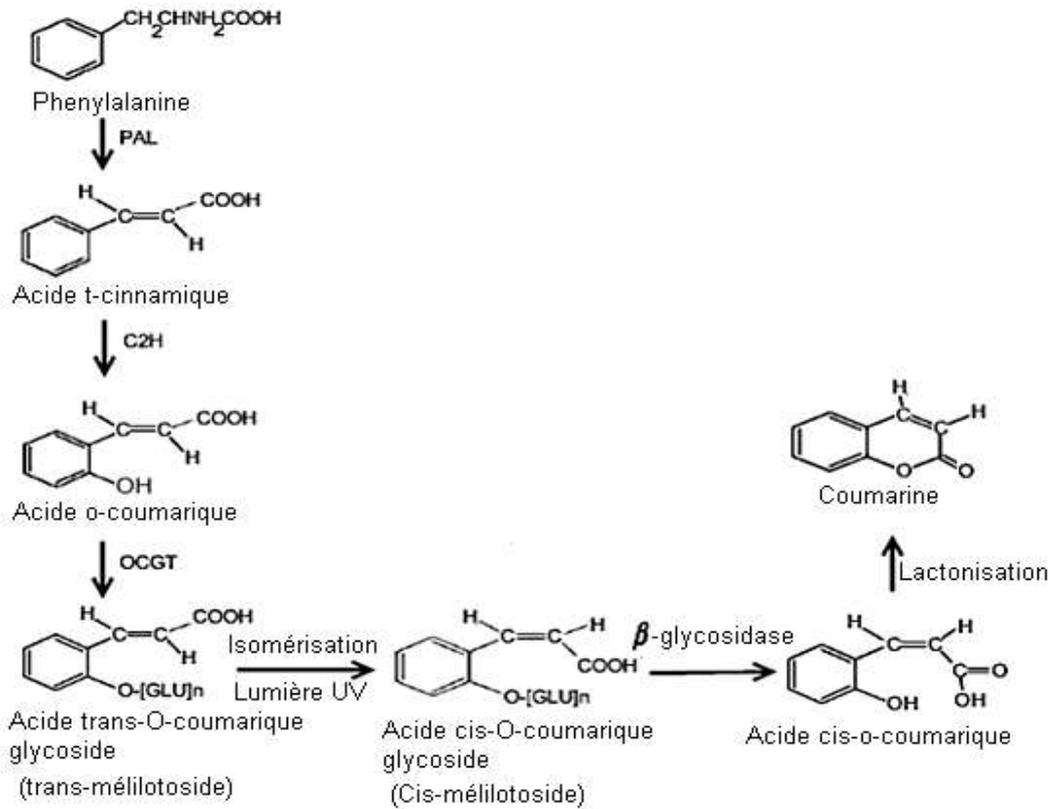


Figure 5: Biosynthèse de la coumarine (d'après POULTON et MCREE, 1980)

PAL = Phénylalanine ammonialyase ; C2H = Cinnamate-2-hydroxylase ;
 OCGT = O-coumarate-glycosyl-transférase.

La coumarine *sensu stricto* appartient à la grande classe des coumarines, métabolites secondaires de nombreuses plantes. La coumarine *sensu stricto* résulte de la transformation de la **phénylalanine** en **acide trans-cinnamique** catalysée par une enzyme intracellulaire, la phénylalanine ammonialyase (PAL). Elle sera suivie de l'action catalysée par l'enzyme Cinnamate-2-hydroxylase (C2H) qui transforme l'**acide trans-cinnamique** en **acide o-coumarique**. L'O-coumarate-glucosyltransferase (OCGT) est responsable de la substitution de l'hydrogène du groupement -hydroxyl, sur la position 'ortho-' de l'acide cinnamique, par une molécule de glucose. Il en résulte l'**acide trans-O-coumarique glycoside** (*trans*-ménilotoside). Ce dernier composé subit une *Trans-Cis* isomérisation sous l'action de la lumière UV, pour donner l'**acide cis-O-coumarique glycoside** (*cis*-ménilotoside) qui sera converti en acide **cis-o-coumarique** après l'action catalysée de la β -glycosidase (coupure de la liaison osidique entre l'acide *cis-o*-coumarique et les sucres). Enfin, la **coumarine** est formée après une lactonisation spontanée du **cis-o-coumarique** (POULTON et MCREE., 1980).

I-A-2-1-2 Utilisation pharmacologique

Dans la phytothérapie, l'herbe Mélilot est une plante médicinale célèbre pour ses effets thérapeutiques: anti-œdémateuse (CASLEY-SMITH et *al.*, 1993), astringent, anti-inflammatoire (le mélilot diminue, *in vivo*, l'activation des phagocytes circulants) (PLESCA-MANEA, 2002), antispasmodique, et anticoagulant (il est utilisé pour traiter les symptômes de fragilité capillaire, la varice, et quelques mineurs désordres circulatoires). Dans la médecine traditionnelle il est utilisé pour traiter la jaunisse (WICHTL et ANTON, 2003). Agissant en synergie, les dérivés coumariniques et la coumarine exercent une action sur la circulation veineuse en augmentant le débit veineux tout en diminuant la perméabilité des capillaires (CASLEY-SMITH, 1999).

I-A-2-2 LES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES

L'acide *t*-cinnamique (fig. 6.A, page 13), est un intermédiaire clef dans la biosynthèse de la lignine (Cf. Annexe I). Il dérive directement de la désamination non oxydative de la phénylalanine catalysée par l'enzyme PAL (HOFFMANN, 2003). Il appartient à la classe des phénylpropanoïdes. Les molécules qui vont être citées ultérieurement dérivent de l'acide *t*-cinnamique. Ils sont souvent trouvés sous estérifiés avec l'acide quinique et rarement sous formes libres.

I-A-2-2-1 L'acide *p*-coumarique

L'acide *p*-coumarique (fig. 6.B, page 13), est présent dans les graines vertes des *Mascarocoffea* sous forme estérifiée (acide *p*-coumaroyl-quinique ApCoQ) selon RAKOTOMALALA, (1992). Cette substance se trouve en majeure quantité parmi les dérivés hydroxycinnamiques, au même rang que l'acide férulique, l'acide sinapique, et l'acide caféique dans les caféiers. C'est aussi un intermédiaire dans la biosynthèse de la lignine.

I-A-2-2-2 L'acide *o*-coumarique

L'acide *o*-coumarique (fig. 6.F, page 13), est présent sous forme estérifiée dans les graines de quelques populations de *Mascarocoffea* (RAKOTOMALALA, 1992). Cette substance est formée à partir de l'hydroxylation de l'acide *t*-cinnamique en position *ortho*-, catalysée par l'enzyme Cinnamate-2-Hydroxylase (C2H) qui n'a pas encore été bien

déterminé. Il semble emprunter aussi la voie de la biosynthèse de la coumarine (fig. 5), car se trouve à la deuxième étape dans ce processus. C'est un précurseur du méliotoside.

I-A-2-2-3 L'acide caféique

L'acide caféique (fig. 6.C, page 13), ou acide (*E*) **3-(3,4-di-hydroxyphényl)-prop-2-énoïque**, est un composé organique naturellement présent dans toutes les plantes (OLTHOF, et *al.*, 2001). C'est un intermédiaire clé dans la biosynthèse de la lignine (Cf. Annexe I) qui forme la paroi végétale. Il est biosynthétisé par hydroxylation de l'acide *para*-coumarique. C'est un précurseur de l'acide férulique (Fig. 6.D, page 13), de l'alcool coniférylique et de l'alcool sinapylique, monomères de la lignine et de la lignane (HOFFMANN., 2003) (Cf. Annexe I).

L'acide caféique se rencontre particulièrement en grande quantité dans le café boisson, d'où il fut isolé pour la première fois au XIXe siècle et dont il tire son nom (une tasse de café en contient 25 à 75 mg). Parmi les autres formes estérifiées courantes, on trouve l'acide caféoyltartrique présent dans le raisin, l'acide caféoylshikimique dans la datte, l'acide caféoylmalique dans le radis.

I-A-2-2-4 L'acide férulique

L'acide férulique ou acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) prop-2-énoïque (Fig. 6.D, page 13), est un acide organique présent, lui ou ses esters, dans de nombreuses plantes. On le trouve dans les graines comme le riz, le blé, l'avoine mais aussi dans le café, les pommes, les artichauts, les oranges et les ananas. (IIYAMA et *al.*, 1994). Son nom provient de *Ferula*, un genre de plantes herbacées de la famille des Apiacées.

L'acide férulique est un phénylpropanoïde, dérivé de l'acide cinnamique qui participe à la synthèse de la lignine (Annexe I), ainsi qu'un précurseur de molécules aromatiques. Dans les plantes, la transformation de l'acide caféique en acide férulique est catalysée par une enzyme spécifique, l'acide caféique-O-méthyltransférase COMT. L'O-méthyltransférase nécessite la présence de méthionine sous forme activée de S-Adénosyl-Méthionine (SAM), (FLEURIET et MACHEIX, 1981).

I-A-2-2-5 L'acide sinapique

L'acide sinapique (Fig. 6.E), est présent presque partout dans les végétaux car étant un intermédiaire dans la formation de la lignine (via acide sinapoyl-CoA). Cette substance est formée à partir de la méthylation de l'acide férulique en position "para-". Les acides hydroxycinnamiques les plus distribués dans les plantes sont l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique (MACHEIX et al., 1990), (Fig. 6).

I-A-2-2-6 Les acides méthoxycinnamiques

Les acides méthoxycinnamiques (Fig. 6.G), sont des métabolites secondaires récemment découvert chez les caféiers par RAKOTOMALALA, (1992) ; (ANDRADE et al., 1998), dans les graines. Ce sont des acides hydroxycinnamiques rares, dans le règne végétal, avec 3 isomères dont les acides 4-, 3,4-di-, 3,4,5-tri-méthoxycinnamiques.

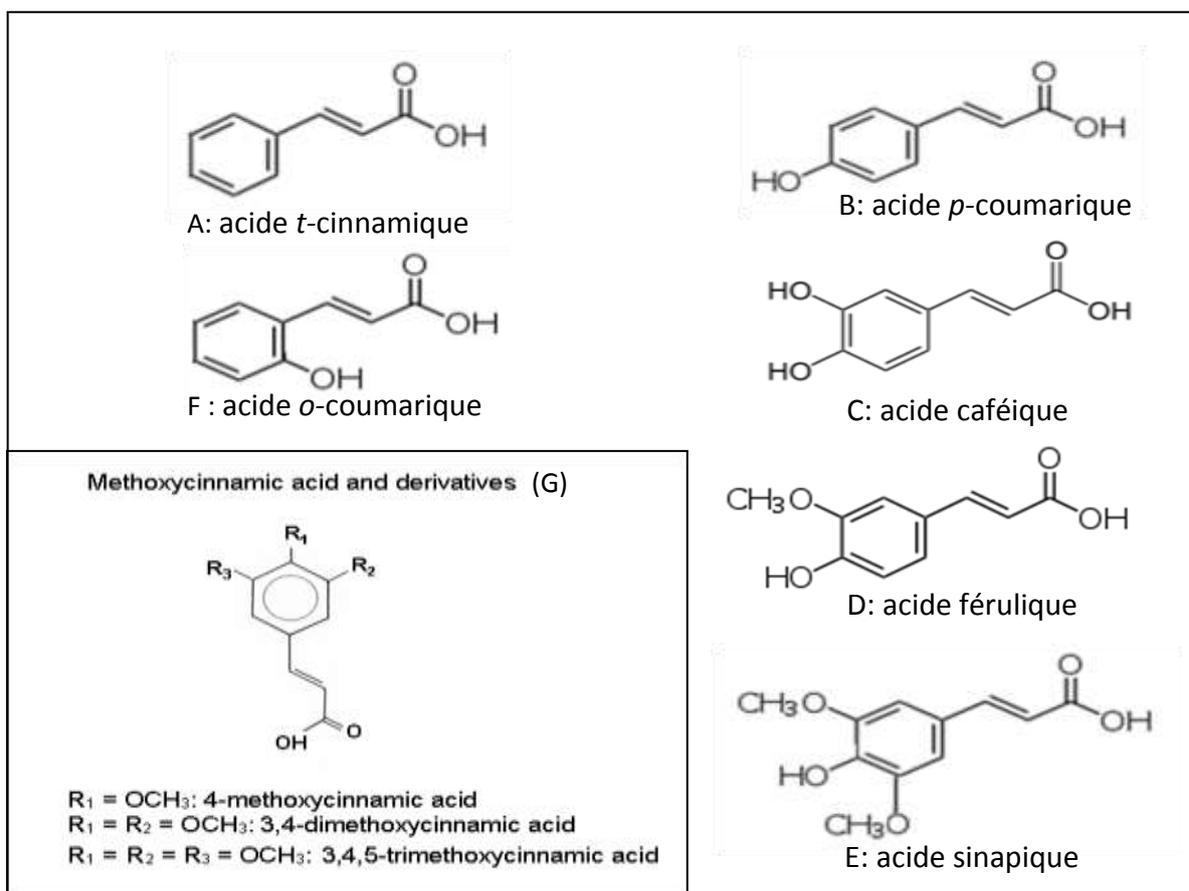


Figure 6: Structures des acides hydroxycinnamiques. (A) acide *t*-cinnamique, (B) acide *p*-coumarique, (C) acide caféique, (D) acide férulique, (E) acide sinapique, (F) acide *o*-coumarique et (G) acides méthoxycinnamiques

I-A-2-3 LES ACIDES CHLOROGENIQUES

Les **Acides Chlorogéniques** (ACG), un terme générique, utilisé pour désigner les composés phénoliques qui fluorescent en vert lors de leur oxydation alcaline (PAYEN, 1946). Ou encore « depsides », une appellation selon les scientifiques anglais, désigne d'une façon générale la condensation d'un groupement "-carboxyl," d'un composé phénolique et d'un groupement "-hydroxyl" d'un autre acide (SONDHEIMER, 1964). Les acides chlorogéniques sont des esters d'acides hydroxycinnamiques.

Les ACG sont des métabolites secondaires de grand intérêt économique à cause de leur dégradation en composés phénoliques. Ils sont présents dans presque toutes les plantes. Ils sont particulièrement abondants chez les de caféiers, cultivées (COLONNA, 1979 ; ANTHONY et *al.*, 1993 ; MONDOLOT et *al.* 2006) et de nombreux caféiers sauvages (*Mascarocoffea*) (RAKOTOMALALA, 1992).

Les ACG sont les acides caféoylquiniques (ACQ), dicaféoylquiniques (AdiCQ), féruloylquiniques (AFQ), *p*-coumaroylquiniques (ApCoQ), caféoylféruloylquiniques (ACFQ), féruloylcaféoylquiniques (AFCQ). On peut avoir aussi les acides, dicaféoyl-*p*-coumaroyl-quiniques (AdiCpCoQ), dicaféoyl-féruloyl-*p*-comaroyl-quiniques (AdiFpCoQ). Les acides di- et tri-méthoxyl-quinique et les acides dicaféoyl-diméthoxyl-quiniques (AdiC-diMetQ) existent aussi sauf qu'ils n'ont pas encore été décrits.

Les 3 sous-groupes des ACG majeurs sont les esters de l'acide quinique avec l'acide caféique [acides caféoylquiniques (ACQ) et acides dicaféoylquiniques (diACQ)] et avec l'acide férulique [acides féruloylquiniques (AFQ)]. Ils représentent 98% de tout les ACG (CLIFFORD, 1985 ; MORISHITA, et *al.*, 1989 ; KY, 2000). Chacune de ces classes est composée de trois isomères selon leur estérification avec l'acide quinique en position 5 puis 3 et 4 de l'-OH de l'acide quinique. L'isomère acide caféoyl-5-quinique (AC5Q) est le constituant majoritaire dans le café vert (CLIFFORD, 1985 ; KY, 2000). La teneur en ACG varie considérablement d'une espèce à l'autre (CLIFFORD et *al.*, 1989, ANTHONY et *al.*, 1993 ; RAKOTOMALALA et *al.*, 1993).

Les ACG participent au contrôle de la germination et de la croissance cellulaire. Ils sont également impliqués dans les mécanismes de défense contre les phytopathogènes (MACHEIX et *al.*, 1990 ; KY, 2000).

Les qualités organoleptiques de café sont, en partie, dues aux ACG (LELOUP et *al.*, 1995). *In vivo* ces composés phénoliques exercent un pouvoir antioxydant et neutralisent l'activité des radicaux libres (IWAHASHI et *al.*, 1990 ; OBERMEYER et *al.*, 1995). Il a été aussi rapporté que l'ACG *sensu stricto* (AC5Q) empêche l'oxydation de la vitamine A et protège contre l'oxydation de l'épinéphrine *in vitro* (CHALLIS et BARTLETT, 1975; PAGANGA et *al.*, 1999).

L'acide quinique forme de liaison ester avec les acides hydroxycinnamiques (sur les fonctions –hydroxyl) pour donner les acides chlorogéniques. Historiquement, l'acide quinique fut isolé pour la première fois en 1790 par un pharmacien allemand LEER HOFMANN, à partir de cinchona et par le chimiste et pharmacien français LOUIS-NICOLAS dans les années 1800 (HOFMANN, 1790). L'acide quinique est souvent estérifié avec des composés phénoliques et forment les acides chlorogéniques.

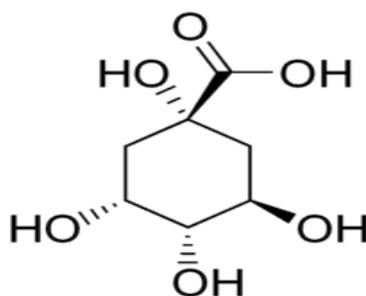


Figure 7: Configuration spatiale de l'acide quinique
(Acide (1S, 3R, 4S, 5R)-1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylique)

I-A-2-3-1 L'acide caféoyl-5-quinique

Historiquement, l'AC5Q ou acide chlorogénique *sensu stricto* (ACGss) a été découvert par ROBIQUET et BOUTRON (1837), dans les grains verts de *C. arabica*. Il fut tout d'abord nommé **acide cafétanique** (ROCHLEDER 1844 ; GAUCHER, 1895). L'appellation actuelle dite "**acide chlorogénique**" devient définitive avec FREUDENBERG (1920) puis FISCHER et DANGSCHAT (1932).

L'AC5Q est l'un des principaux composés phénoliques du café. Il est également plus répandu dans le règne végétal où on peut l'isoler à partir des feuilles ou des fruits (CLIFFORD, 2003). C'est un précurseur de l'acide dicaféoylquinique (CLIFFORD, 1999).

I-A-2-3-2 Les acides féruloylquiniques

Les acides féruloylquiniques (AFQ) possèdent aussi 3 isomères selon la position de l'acide quinique lors de son estérification avec l'acide férulique à savoir l'acide féruloyl-3-quinique (AF3Q), acide féruloyl-4-quinique (AF4Q) et l'acide féruloyl-5-quinique (AF5Q) (Fig.8); (CLIFFORD et *al.*, 1991). Ces trois isomères ont des propriétés antioxydantes, hypoglycémiantes et antivirales (FARAH et DONANGELO, 2006)

I-A-2-3-3 Les acides dicaféoylquiniques

Après la mise au point par SLOTTA et NEISSER (1939) d'une méthode iodométrique de dosage, on a constaté que le composé dosé sous le nom d'acide chlorogénique, représentait environ 6 % du poids du café vert (*C. arabica*). Or, d'autres chercheurs n'ont jamais que les deux tiers de cette quantité. On pensa alors à l'existence, chez le caféier, d'isomères de l'acide chlorogénique. BARNES et ses collaborateurs montrèrent en 1950 que le sixième au moins de ces 6 % devait être attribué à une substance non cristallisée, extraite du grain de café, tandis que SCARPATI et GUIISO (1963, 1964) trouvaient qu'il s'agissait d'un mélange de trois acides dicaféoylquiniques. Ce résultat fut confirmé (HANSON et ZUCKER, 1963 ; CORSE, et *al.*, 1965) . Ces auteurs établirent que ces corps étaient les acides 3,4 -, 3,5- et 4,5-dicaféoylquiniques.

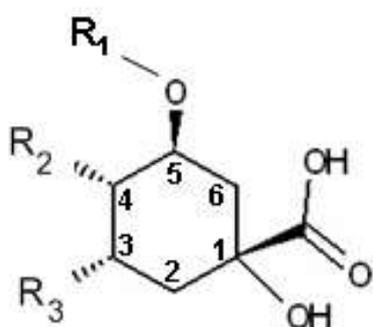


Figure 8: Quelques isomères des ACG

$R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Acide quinique

$R_1 = \text{acide cafèique} ; R_2 = R_3 = OH$: Acide 5-caféoyl quinique (AC5Q)

$R_1 = \text{acide férulique} ; R_2 = R_3 = OH$: Acide féruloyl-5-quinique (AF5Q).

$R_1 = R_3 = OH ; R_2 = \text{acide } p\text{-coumarique}$: Acide *p*-coumaroyl-5-quinique (ApCo5Q).

$R_1 = R_3 = \text{acide cafèique} ; R_2 = OH$: Acide di-caféoyl-3,5-quinique (Adi-3,5-CQ).

$R_1 = R_2 = \text{acide cafèique} ; R_3 = OH$: Acide di-caféoyl-4,5-quinique (Adi-4,5-CQ).

I-A-2-4 LA TRIGONELLINE

La trigonelline (Fig. 9.A), ou (Acide 1N-méthylnicotinique) est un alcaloïde produisant, après torréfaction, des dérivés des pyridines et pyroles (composés importants dans l'arôme). Elle est aussi impliquée dans la chaîne de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques (KY et *al.*, 2001 ; ZENG, 2004). La trigonelline est présente dans les grains de café

I-A-2-5 LA CAFEINE

La caféine (Fig.9.B), est un alcaloïde purique (1,3,7, N-méthylxanthine), présente chez les cafés cultivés mais absente chez les *Mascarocoffea* excepté 2 taxons (*C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*). La caféine est une substance rigide, ne se décompose pas par la torréfaction. Elle participe dans le goût d'une tasse de café. Cette substance stimule le système nerveux et provoquant l'insomnie.

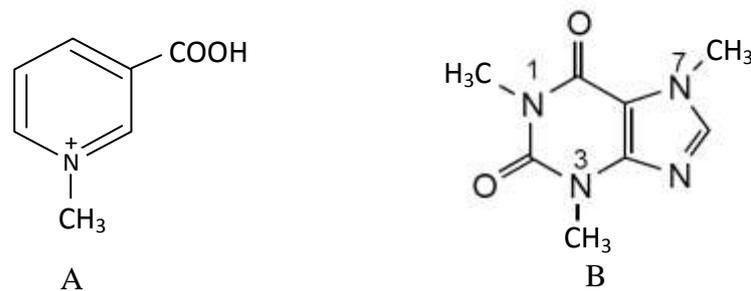


Figure 9: (A) Trigonelline, (B) Caféine

MATERIELS ET METHODES

I-B MATERIELS ET METHODES

I-B-1 MATERIELS

I-B-1-1 MATERIEL VEGETAL

Les feuilles de cinq populations de *Mascarocoffea* de la série botanique *Multiflorae* dont *C. sp A315*, *C. sp A311*, *C. A227* (*Coffea andrambovatensis*), *C. A525* (*C. ankaranensis*), et *C. A808* (*C. ankaranensis*) font le sujet d'étude dans le cadre de ce mémoire. Les feuilles de *C. arabica*, *C. canephora* servent de témoin ainsi que *Melilotus officinalis* pour sa richesse en mélilotoside. Les feuilles des caféiers sont récoltées dans la station de collection de FOFIFA à Kianjavato.

I-B-1-1-1 La station de Kianjavato

Kianjavato se trouve dans la région de Vatovavy Fitovinany, à 125 km de Fianarantsoa sur la route nationale n°25, à 75 km de Mananjary, à 12 km à l'Ouest de la montagne de Vatovavy. La station est située en basse altitude (70 m par rapport au niveau de la mer), sur la côte Est. Ses coordonnées géographiques sont : 21° latitude sud, 48° longitude Est (Fig. 10). Le climat est du type tropical humide. Actuellement, cette station abrite environ 3960 pieds de caféiers.

I-B-1-1-2 Présentation des échantillons à étudier

Les identités des échantillons de caféiers à étudier sont résumées sur le tableau 1.

Tableau 1: Présentation des échantillons végétaux.

	Code d'identification	Accession	Origine phytogéographique
<i>Multiflorae</i>	A 227	<i>C. andrambovatensis</i>	Andrambovato (Tolongoïna)
	A 311	<i>C. sp</i>	Madorano (Tolongoïna)
	A 315	<i>C. sp</i>	Ambodirafia (Ifanadiana)
	A525	<i>C. ankaranensis</i>	Antsiranana
	A808	<i>C. ankaranensis</i>	Antsiranana
Témoins		<i>C. canephora</i>	Afrique
		<i>C. arabica</i>	Afrique
		<i>Melilotus officinalis</i>	Europe

Le mélilot jaune est également utilisé, comme plante témoin pour sa richesse en mélilotoside.

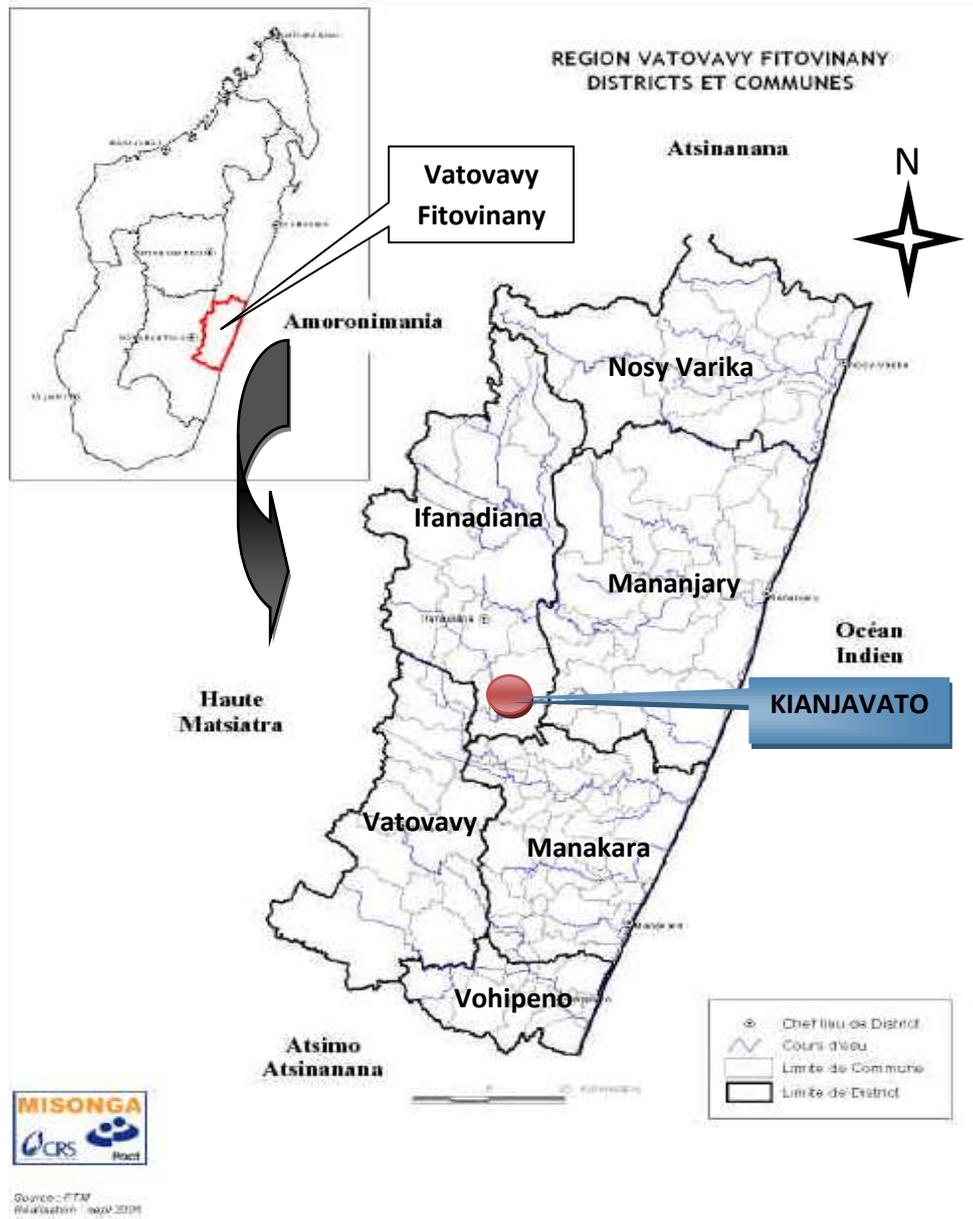


Figure 10: Carte de représentation de la station de collection (Source : ONE, 2006)

I-B-1-1-3 Répartition des feuilles en lots

Les feuilles de chaque espèce collectées sont distribuées en 3 lots suivant leur âge puis en 3 lots suivant leur moment de prélèvement.

- Le premier lot comprend les très jeunes feuilles : il constitue les premières ou deuxièmes feuilles à partir du bourgeon terminal (prélevées à 7 heures, à 11 heures et à 15 heures)
- Le deuxième lot est constitué les jeunes feuilles : il constitue les troisièmes feuilles à partir du bourgeon terminal (prélevées à 7 heures, à 11 heures et à 15 heures).
- Le troisième lot est constitué des quatrièmes feuilles à partir du bourgeon terminal (prélevées à 7 heures, à 11 heures et à 15 heures).

Au total, notre étude comporte 63 échantillons de feuilles.

I-B-1-2 LES SUBSTANCES DE REFERENCE

Les substances de référence (standard) proviennent du laboratoire de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier (France).

- Coumarine (Cou)
- Acide *o*-coumarique (O-cou)
- Acide *p*-coumarique (p-cou)
- Acide caféoyl-5-quinique (AC5Q)
- Acide férulique (Fer)
- Acide diméthoxycinnamique (Di-M)
- Caféine (CAF)
- Trigonelline TRG

I-B-2 METHODES

I-B-2-1 PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

Les feuilles fraîches sont nettoyées puis séchées à 37°C dans une étuve. Le séchage permet de débarrasser l'eau jusqu'à 2/3 de leur poids initial. Les feuilles sèches sont ensuite broyées dans un broyeur à couteaux. La poudre obtenue sert de matière première pour notre étude.

I-B-2-2 EXTRACTION

SONDHEIMER (1964) a précisé les caractéristiques de solubilité de l'acide chlorogénique dont les meilleurs solvants sont le méthanol puis l'éthanol. L'extraction par ces solvants se pratique couramment (ANDERSON, 1968 ; TANGUY, 1970). Pour obtenir un bon rendement, l'eau doit être présente (FISHER, 1965 ; 1966) dans une proportion d'au moins 20% (MACHEIX, 1974). Elle rompt, en particulier les liaisons qui peuvent se former avec les protéines (COLONNA, 1979).

De ces faits, l'extraction hydroalcoolique à froid est choisie pour notre expérimentation. Deux grammes de poudre des feuilles de café sont macérés dans 40 ml de mélange Ethanol-Eau (70/30, V/V) pendant trois heures, sous agitation magnétique, à la température de la salle. Puis le mélange ainsi obtenu est filtré.

L'alcool est ensuite évaporé (Rotavapor BUCHI. RE) à 30°C et donne une fraction aqueuse résiduelle brute. Cette dernière est centrifugée à 14 000 tr/min. Le culot est éliminé tandis que le surnageant, noté **P₁** est récupéré.

I-B-2-3 PURIFICATION PARTIELLE

Les chlorophylles, les caroténoïdes et les xanthophylles sont des pigments qui peuvent gêner l'observation des spots caractéristiques de chaque substance en CCM. Il est préférable de les éliminer. Le lavage avec l'éther de pétrole (PE) convient mieux pour cette action car l'acide chlorogénique et ses isomères ainsi que la caféine n'y sont que faiblement solubles

(COLONNA, 1968). L'extrait aqueux P_1 est lavé trois fois (1/1 ; V/V), avec l'éther de pétrole.

La phase supérieure, éther de pétrole ; notée **PE**, est éliminée par une décantation. La phase aqueuse inférieure, notée P_2 , est ensuite traitée par 1 ml de **réactif A**, plus 1 ml de **réactif B** de CARREZ (Cf. Annexe II). Les protéines solubles, les polysaccharides et les autres substances colloïdales précipitent par la suite (CLIFFORD, 1985 ; RAKOTOMALALA, 1992) et sont éliminées par une filtration (Wattman N°1) et centrifugation. La fraction obtenue, noté P_3 , constitue notre extrait aqueux final, partiellement purifié.

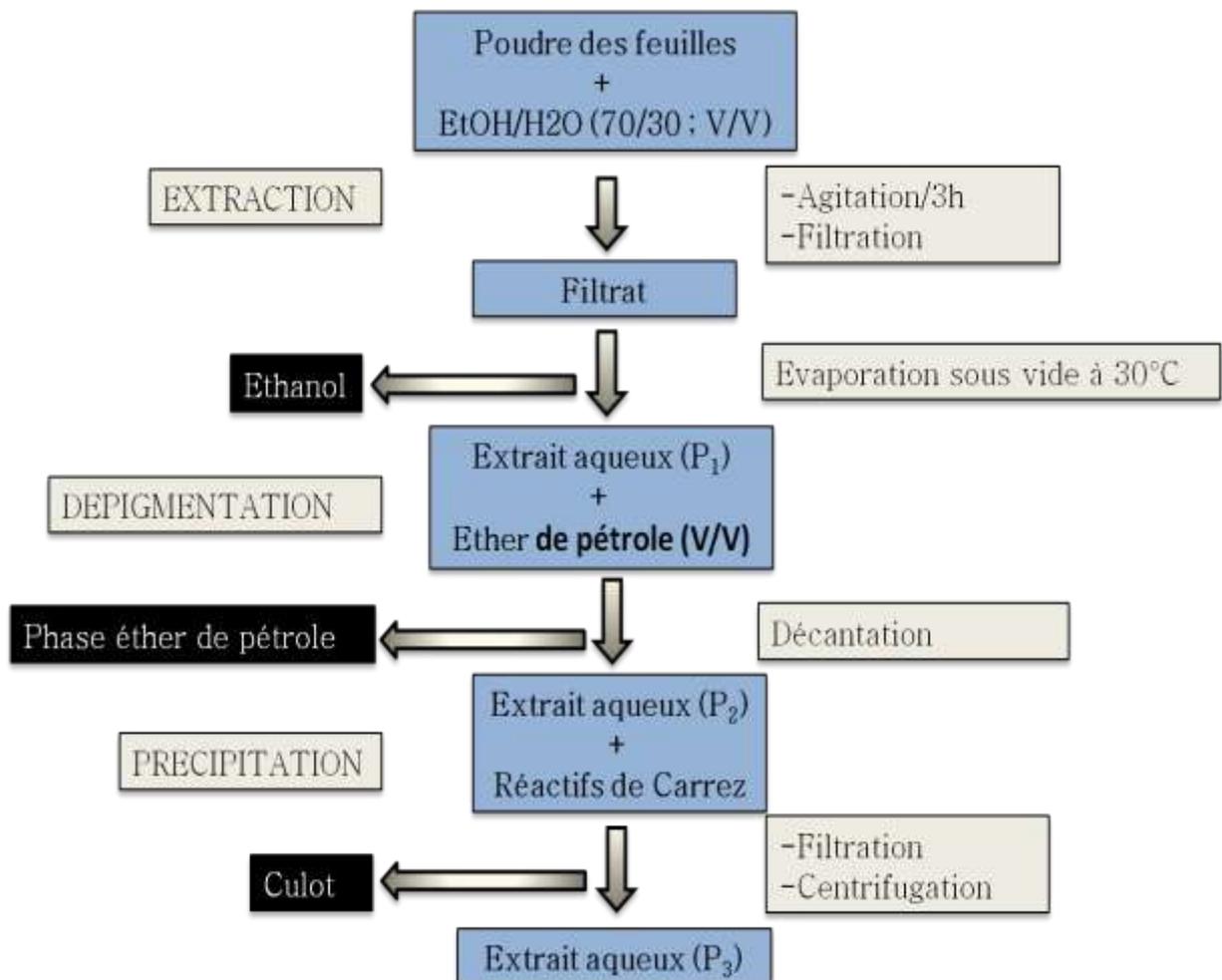


Figure 11: Schéma récapitulatif de l'extraction des métabolites secondaires des feuilles

I-B-2-4 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

I-B-2-4-1 Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption et d'interaction. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé, les substances migrent essentiellement par capillarité. La vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. Généralement, en CCM, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

I-B-2-4-2 Mode opératoire

Deux éluants sont choisis dus à leurs caractéristiques compatibles avec les substances ciblées. La phase supérieure du mélange Méthylisobutylcétone-acide Formique-Eau ou MFE (3/1/2 ; V/V/V) selon JEAN et REID (1959) permet de séparer les différents depsides d'un extrait hydroalcoolique des caféiers. Tandis que la phase supérieure de Butanol-Ammoniaque 2% ou BA (1/1 ; V/V) permet de distinguer les glycosides qui migrent faiblement (MACHEIX, 1974 ; RAKOTOMALALA et *al*, 1993).

Les échantillons sont déposés à l'aide d'un capillaire, à 1,5cm du bord inférieur et à 1,3 cm des bords verticaux de la plaque (Silicagel F₂₅₄, 20x20 cm²), sous forme de traits horizontaux de 0,7 cm espacés de 0,6 cm. La distance de migration du solvant est fixée à 7 cm. La plaque est placée en position verticale dans une cuve à chromatographie (DESAGA-HEIDELBERG 22x22x10 cm³) préalablement saturée par la vapeur du solvant de migration. C'est une chromatographie monodimensionnelle et ascendante. La plaque est retirée de la cuve après l'élution, puis séchée à l'aide d'un séchoir électrique.

L'observation sous la lumière UV, à la longueur d'onde de 254 nm et/ou de 360 nm, permet de caractériser les spots (fluorescence, référence frontale). La vapeur ammoniacale est utilisée comme révélateur (réversible).

La référence frontale (Rf), est le rapport de la distance parcourue par la substance (cm) et la distance parcourue par le solvant (cm).

$$\text{Référence frontale (Rf)} = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

I-C RESULTATS ET DISCUSSION

I-C-1 CHROMATOGRAPHIE PREPARATOIRE

En CCM préparatoire, tous les extraits sont observés sous lumière UV aux longueurs d'onde de 254 nm et de 360 nm. Il s'avère que le contenu optimum en diversité et en quantité de composés s'observe dans les extraits des très jeunes feuilles peu importe l'heure de prélèvement. La suite de l'étude a été effectuée uniquement sur les très jeunes feuilles.

I-C-2 CHROMATOGRAMME DANS LE SOLVANT MFE

Les figures 12 et 14 représentent les profils chromatographiques des extraits hydroalcooliques des feuilles de *C. A315*, *C. A311*, *C. A227*, *C. A525*, *C. A808*.

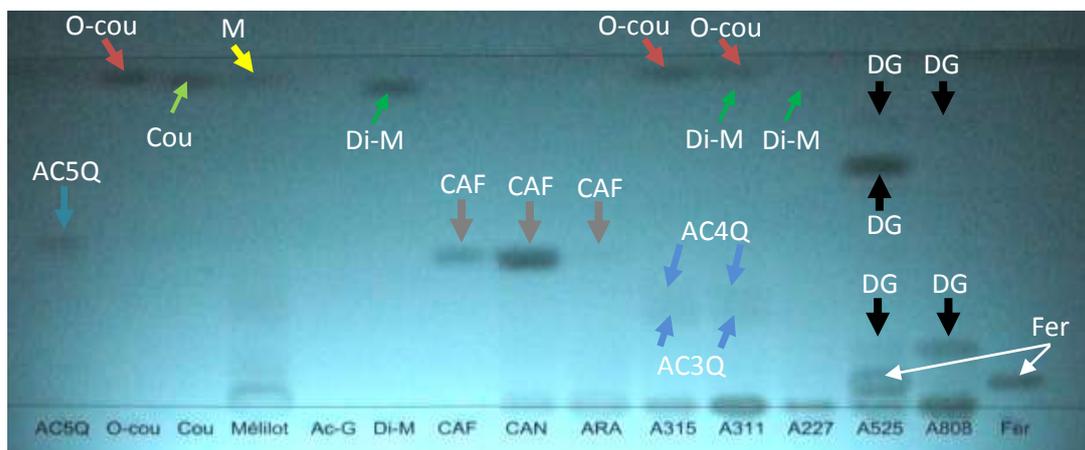


Figure 12: Chromatogramme des extraits hydroalcooliques de *Coffea A311*, *A315*, *A525*, *A808* sous UV à 254nm, solvant MFE

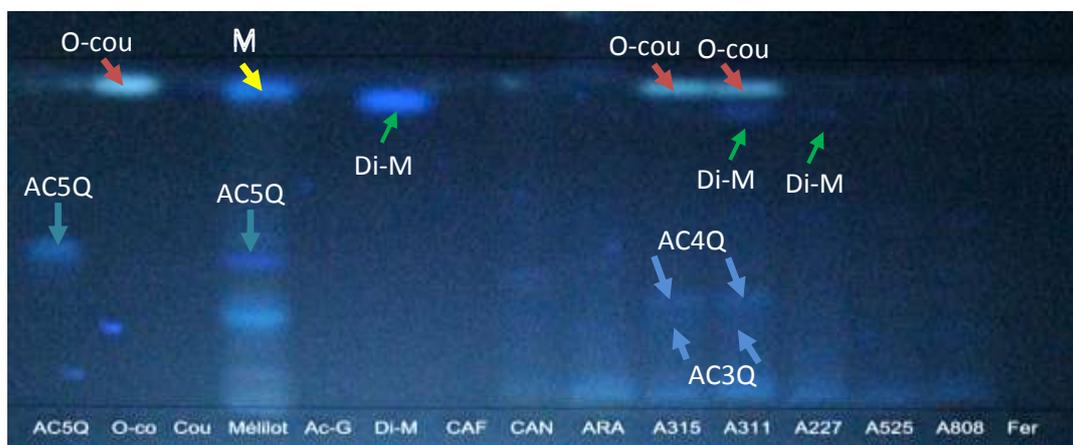


Figure 13: Chromatogramme des extraits hydroalcooliques de *Coffea A311*, *A315*, *A525*, *A808* sous UV à 360nm, solvant MFE.

Les témoins Melilot, *C. canephora* (CAN), *C. arabica* (ARA) ainsi que les substances standards (acide-5-caféoylquinique (AC5Q), acide *o*-coumarate (O-cou), coumarine (Cou), acide diméthoxycinnamique (Di-M) et (CAF) caféine) sont utilisés. Ces profils ont été observés sous UV. La phase supérieure du solvant de migration, Méthylisobutylcétone (MFE) est utilisée. Avec ce solvant, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les substances polaires. Chaque spot est identifié puis caractérisé (référence frontale, couleur de fluorescence).

Le tableau 2 montre les profils de migration en CCM des extraits dans le solvant MFE.

Tableau 2: Profils des extraits aqueux des feuilles en CCM (solvant MFE)

Caractéristiques des substances				Extraits aqueux (solvant de migration MFE)							
Rf	Noms	Fluorescence		Mélilot	A 315	A 311	A 227	A 525	A 808	<i>Coffea Arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
		254 nm	360 nm								
0,01	TRG	NOI	BLE	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
0,08	Fer	NOI	INV	-	-	-	-	(+)	-	-	-
0,20	-	NOI	BLE	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-
0,24	-	GRS	BLC	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
0,31	-	NOI	BLC	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
0,44	CAF	NOI	INV	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
0,48	AC5Q	GRF	BLV	(+)	t	t	t	t	t	(+)	(+)
0,69	-	NOI	INV	-	-	-	-	(+)	-	-	-
0,81	-	NOI	INV	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-
0,89	Di-M	NOI	BLE	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-
0,90	-	GRS	BLE	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-
0,90	Cou	NOI	INV	(+)	-	-	-	-	-	-	-
0,92	O-Cou	NOI	VEJ	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-

NOI = noire, GRS = grise, GRF = gris-foncé, BLE = bleu, BLC = bleu-clair, VEJ = vert-jaune, INV = invisible, Rf=référence frontale, (+) = présent, (-) = absent, t = trace.

TRG = trigonelline, Fer = férulate, CAF = caféine, AC5Q = Acide caféoyl-5-quinique, Di-M = diméthoxycinnamate, Cou = coumarine, O-cou = *o*-coumarate.

Certains spots sont faciles à déterminer grâce aux substances de référence disponibles. Parmi celles-ci :

La trigonelline TRG, Rf=0,01, est présente dans tous les extraits et à plus forte concentration dans l'extrait de feuilles de *C. arabica*, *C. A311* et *C. A808*.

L'acide férulique (Fer), Rf=0,08, n'est présent que dans l'extrait de *C. A525*.

La caféine (CAF), Rf=0,44, est présente uniquement dans les témoins *C. canephora* (en grande quantité) et dans *C. arabica*.

L'AC5Q, $R_f=0,48$, est présent uniquement dans les deux espèces témoins *C. arabica* (ARA) et *C. canephora* (CAN) et à l'état de traces chez les cinq populations de *Mascarocoffea*.

L'acide diméthoxycinnamique (Di-M), $R_f=0,89$, est présent dans les extraits de feuille de *C. A311* et *C. A227*.

La coumarine (Cou), $R_f=0,90$, est présente dans le témoin *Melilotus officinalis*.

L'acide *ortho*-coumarique (O-cou), $R_f=0,92$, passe du noir à 254 nm au bleu turquoise à 360 nm, est présent dans *C. A315* et *C. A311*.

Le spot à $R_f=0,24$, représente une substance appartenant à l'extrait de *C. A808*. Il est aussi présent dans l'extrait de *C. A525*, à l'état de traces. Ce spot est plus foncé à 254 nm et fluoresce en bleu à 360 nm comme AC5Q. Comme le solvant MFE sépare bien les monocaféoylquiniques (COLONNA, 1979), cette substance pourrait être l'AC3Q.

Le spot à $R_f=0,31$, représente une substance commune de *C. A315* et *C. A311* dont la fluorescence est la même que celle de AC5Q. Cette substance pourrait être le monocaféoylquinique l'AC4Q (COLONNA, 1979). Selon toujours cet auteur, la référence frontale de AC3Q est plus faible que celle de AC4Q.

La substance à $R_f=0,69$, se trouve à forte concentration. Elle est présente seulement chez les très jeunes feuilles de *C. A525*. Elle pourrait être un alcaloïde (méthylxanthine) car visible uniquement à 254 nm comme la CAF (CAMPA, communication personnelle en 2011) ou un diterpène glycosidique (RAKOTOMALALA, communication personnelle en 2011).

Le spot à $R_f=0,81$ est commun à *C. A525* et *C. A808*. Il est visible seulement à la longueur d'onde 254 nm et pourrait être également une méthylxanthine ou un diterpène glycosidique.

La substance qui a une $R_f=0,90$, est présente dans *Melilotus officinalis*. Elle est à la fois trouvée dans les feuilles de *C. A315* et de *C. A311*. Elle se colore en gris à 254 nm tandis qu'elle fluoresce en bleu clair à la longueur d'onde 360 nm. Elle est dissimulée par la fluorescence de l'acide *ortho*-coumarique qui prédomine chez *C. A315* et *C. A311*. Il se pourrait que cette substance soit le mélilotoside.

I-C-3 CHROMATOGRAMME DANS LE SOLVANT BA

Le solvant BA (phase supérieure) est moins apolaire que le solvant MFE. Les diterpènes glycosidiques (mascarosides et cafamarine), y migrent faiblement (RAKOTOMALALA, 1992).

Les figures 14 et 15, montrent les profils chromatographiques de ces mêmes extraits, utilisant le solvant de migration Butanol-Ammoniac (BA).

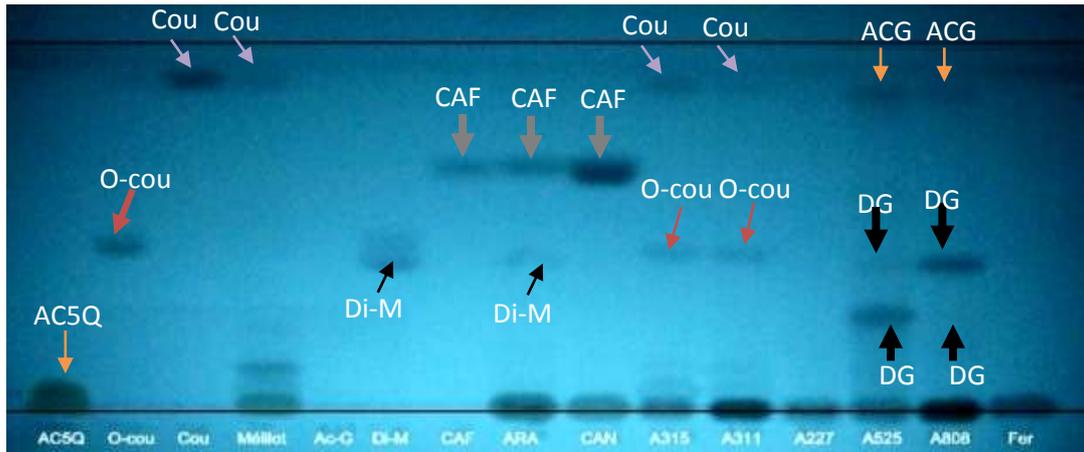


Figure 14: Chromatogramme des extraits hydroalcooliques des populations de *Coffea* A315, A311, A227, A525 et A808 sous UV à 254nm, solvant BA.

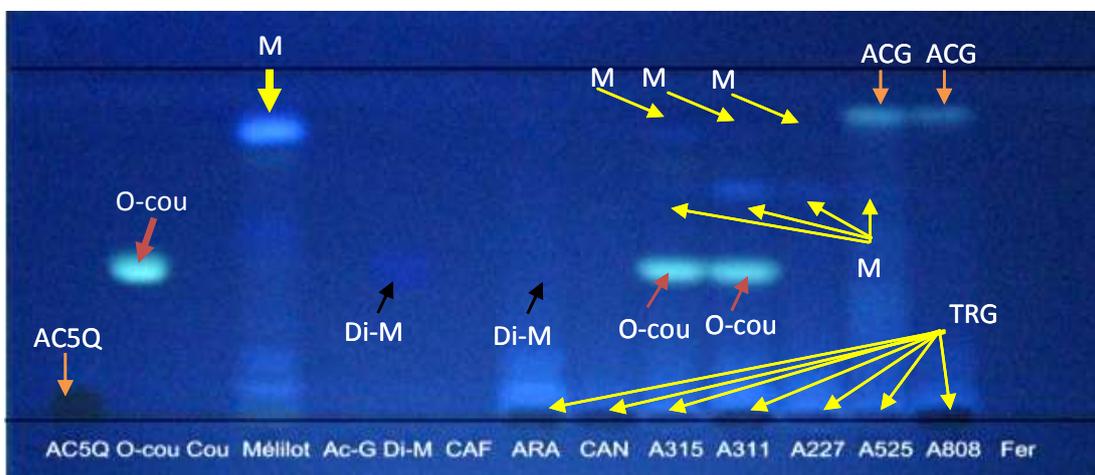


Figure 15: Chromatogramme des extraits hydroalcooliques des populations de *Coffea* A315, A311, A227, A525 et A808 sous UV à 360nm, solvant BA.

Les profils chromatographiques des extraits des feuilles et des standards sont rapportés dans le tableau 3 (page 29). Le solvant de migration est le butanol-Ammoniac.

Tableau 3: Profils des extraits aqueux des feuilles en CCM, solvant BA.

Rf	Standard			Extraits aqueux (solvant de migration BA)							
	Noms	Fluorescence		Mélilot	A 315	A 311	A 227	A 525	A 808	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>
		254 nm	360 Nm								
0,00	TRG	NOI	BLC	-	(+)	(++)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
0,00	FER	GRF	INV	-	-	-	-	(+)	-	-	-
0,05	AC5Q	NOI	BLC	(+)	trace	trace	-	-	Trace	(+)	(+)
0,17		GRF	BLC	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-
0,31		NOI	INV	-	-	-	-	(+)	-	-	-
0,44		GRF	INV	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-
0,45	Di-M	GRIS	BLE	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	-
0,45	O-Cou	GRS	VEJ	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
0,69	-	INV	BLC	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-
0,71	CAF	GRF	INV	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
0,85	-	INV	BLC	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-
0,87		GRF	VEJ	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-
0,9	Cou	GRF	INV	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-

NOI = noire, GRS = grise, GRF = gris-foncé, BLE = bleu, BLC = bleu-clair, VEJ = vert-jaune, INV = invisible, Rf=référence frontale, (+) = présent, (++) = en grande quantité, (-) = absent, t = trace. TRG = trigonelline, Fer = férulate, CAF = caféine, AC5Q = Acide caféoyl-5-quinique, Di-M = diméthoxycinnamate, Cou = coumarine, O-cou = o-coumarate.

Selon les substances de référence disponible :

L'acide férulique (Fer) (visible uniquement chez *C. A525*) et la trigonelline (TRG) ont la même référence frontale (Rf=0). Ils sont trop polaires et ne migrent pas dans le solvant BA. La trigonelline se distingue seulement par sa coloration plus foncée à 254 nm dans tous les échantillons ; surtout chez le témoin *C. arabica* ainsi que chez *C. A311* et *C. A808*. De plus, la trigonelline fluoresce en bleu clair avec un centre sombre à 360 nm alors que l'acide férulique y est invisible.

L'AC5Q, Rf=0,05, est présent chez les feuilles de Mélilot jaune, *C. arabica* et à l'état de trace chez *C. A315*, *C. A311*, *C. A808*.

L'acide diméthoxycinnamique (Di-M) à Rf=0,45, est présent dans l'extrait hydroalcoolique de *C. arabica*. Dans les cas de *C. A315* et *C. A311*, les références frontales de Di-M et de l'O-cou se confondent à 0,45 dans ce solvant où la fluorescence de l'O-cou prédomine à 360 nm.

L'acide *ortho*-coumarique (O-cou), Rf=0,45, se colore en gris foncé à 254 nm et en jaune claire à 360 nm. Cette substance est présente dans les extraits de *C. A315* et *C. A311*.

La caféine (CAF), Rf=0,71 est présente seulement dans les témoins *C. arabica* et chez *C. canephora*, en teneur plus élevée.

La coumarine (Cou), $R_f=0,9$, est présente chez le témoin Mélilot jaune ainsi que chez *C. A315* et *C. A311*. Elle est colorée en gris clair à la longueur d'onde 254 nm. Par contre elle est invisible à la longueur d'onde 360 nm.

Le spot qui a un $R_f=0,17$, est présent dans le témoin Mélilot jaune, *C. arabica* ainsi que chez *C. A315*, *C. A311* et *C. A808* mais à une faible intensité. Cette substance a une fluorescence semblable à l'AC5Q. Elle pourrait être un monocafoéoylquinique, soit AC3Q, soit AC4Q.

Le spot à $R_f=0,31$, se colore en gris noir à 254 nm et est invisible à 360 nm. Cette substance n'apparaît que seulement dans l'extrait de *C. A525*. Elle pourrait être un alcaloïde dérivé de la caféine (méthylxanthine) ou un diterpène glycosidique.

Le spot à $R_f=0,44$, se colore en gris noir à 254 nm et est invisible à 360 nm. Il pourrait être un alcaloïde autre que la caféine (CAMP, communication personnelle, 2011), telle que la théacrine, la théophylline et la théobromine. Il pourrait être aussi un diterpène glycosidique car le solvant BA le sépare bien. Cette substance est caractéristique de *C. A525* et *C. A808*.

Le spot à $R_f=0,85$, est invisible à 254 nm et se colore en bleu clair à 360 nm. Il est présent nettement dans l'extrait témoin *Melilotus officinalis* et plus ou moins atténué chez les extraits de *C. A315*, *C. A311*, *C. A227* et *C. A525*. Cette substance est la plus commune de ce groupe de *C. sp A315* d'une part et de Mélilot d'autre part. Elle pourrait être le mélilotoside (M).

Le spot qui à une $R_f=0,69$ est invisible à 254 nm et se colore en bleu clair atténué à 360 nm. Elle représente une substance similaire à celle qu'on trouve chez le témoin mélilot ainsi que chez *C. A311*, *C. A227* et *C. A525*. Elle pourrait être un isomère du mélilotoside.

La substance à $R_f=0,87$ fluorescence comme l'acide *ortho*-coumarique. Elle représente une substance commune de *C. A525* et *C. A808*. Elle pourrait être un autre dérivé ester de l'acide *o*-coumarique ou d'un autre ACG (acide chlorogénique, par exemple, un ester quinique de l'acide *o*-coumarique) ; selon RAKOTOMALALA (communication personnelle en 2011). Cette substance pourrait correspondre aussi à des fractions non cristallisables des dicafoéoylquiniques (SCARPATI et GUIISO 1963, 1964 ; COLONNA, 1979) et sont caractéristiques de *C. A808* et *C. A525*.

CONCLUSIONS

I-D CONCLUSIONS

L'analyse chromatographique (CCM), a été utilisée pour l'identification des métabolites secondaires. Cependant, l'absence de quelques standards (les autres mono- et di-esters des acides chlorogéniques), ainsi que des révélateurs spécifiques comme le paranitraniline (pour les isomères des composés phénoliques) et le réactif de Bénédict (pour les groupements *o*-diphénols) (FLEURIET et MACHEIX, 1981), ne nous a pas permis de confirmer avec exactitude la nature de certaines substances.

Néanmoins, les méthodes d'extraction et purification utilisées sur les échantillons de feuilles ont été performantes pour les familles des substances ciblées (COLONNA, 1979 ; RAKOTOMALALA, 1992). Ce sont les dérivés hydroxycinnamiques libres, les acides chlorogéniques, les coumarines, les alcaloïdes (la caféine et la trigonelline).

Il existe une conformité entre les feuilles et les graines pour la caféine. Ce résultat coïncide avec ceux de CHARRIER et BERTRAUD, 1975 ; COLONNA, 1979 ; CLIFFORD, 1991 ; RAKOTOMALALA, 1992 sur les graines.

Chez les *Multiflorae*, les feuilles de chaque taxon contiennent diverses substances communes ou particulières. Parmi celles-ci, la trigonelline se trouvant dans les caféiers cultivés (CAMPA et al., 2004 ; ZHENG et al., 2004), est présente partout dans les extraits aqueux des feuilles de nos cinq populations des *Mascarocoffea*.

Dans les feuilles l'acide 5-caféoylquinique est présent chez les témoins et, à l'état de traces chez *C. sp A315*, *C. sp A311* et *C. A808*. Cependant, les acides 3- et 4-caféoylquiniques y sont les plus représentés, contrairement aux résultats de RAKOTOMALALA et ses collaborateurs, (1993) sur les graines.

La substance qui possède une $R_f=0,85$ (solvant BA), se trouvant chez le témoin Mélilot, d'une part, ainsi que chez *C. sp A315*, *C. sp A311*, *C. A227* et *C. A525* (groupe de *C. A315* excepté *C. A808*) d'autre part, pourrait être le mélilotoside ou l'acide *trans*-2- β -glycosyl-oxy-cinnamique (RAKOTOMALALA, 1992). Cette substance est particulièrement présente en grande quantité chez *Melilotus officinalis* (WICHTL et ANTON, 2003) et dans *Dendrobium aurantiacum* var *denneanum* de la famille des orchidacées (YANG et al., 2007). Parallèlement, la substance qui possède une $R_f = 0,69$ (solvant BA) fluoresce comme le

ménilotoside. Elle pourrait être un autre isomère du ménilotoside trouvé chez *C. A311*, *C. A227* et *C. A525*. Vu que, la β -glycosidase semble absente chez les *Mascarocoffea* car la coumarine n'a pas été trouvée dans les graines, selon RAKOTOMALALA, (1992) ; dans les feuilles du groupe de *C. sp A315*, le ménilotoside pourrait donc se présenter sous ses deux formes (isomères) : le *trans*-ménilotoside et *cis*-ménilotoside (POULTON et MCREE, 1980 ; MURRAY et al. 1982 ; MATERN et al., 1988 ; BROWN et ZOBEL, 1990). Cette substance est abondante dans les graines du groupe de *C. A315* n'est représenté qu'à l'état de traces chez les feuilles.

Les *C. A315* et *C. A311* se singularisent par la présence de l'acide *o*-coumarique en quantité élevée. C'est un précurseur du ménilotoside, absent dans les graines mais visibles nettement dans les feuilles. On y trouverait aussi la coumarine.

Les *C. A311*, *C. A227* et *C. arabica* (RAKOTOMALALA, 1992 ; ANDRADE et al. 1998) contiennent en particulier de l'acide diméthoxycinnamique à l'état de traces.

Les substances dont leurs standards sont absents, sont identifiées selon la méthode bibliographique. La substance qui a une $R_f=0,2$ (solvant MFE), pourrait être un monocaféoylquinique (COLONNA, 1979). La substance qui a une $R_f=0,81$ (solvant MFE) et à 0.44 (solvant BA) représenterait une méthylxanthine ou un diterpène glycosidique. Ces substances sont trouvées en grande quantité chez les *Mascarocoffea* selon RAKOTOMALALA (Communication personnelle en 2011). Celle qui a une $R_f=0,87$ représenterait les fractions non cristallisable des dicaféoylquiniques (SCARPATI et GUIISO 1963, 1964 ; COLONNA, 1979) et sont caractéristiques de *C. A808* et *C A525*.

Pour les substances particulières de chaque taxon étudié, on trouve l'acide férulique chez *C. A525*. Le composé ($R_f=0,69$ dans le solvant MFE et $R_f=0,31$ dans le solvant BA) pourrait être soit une méthylxanthine (théophylline, théacrine, théobromine), soit un diterpène glycosidique selon RAKOTOMALALA (communication personnelle en 2011) dans les feuilles de *C. A525*.

Les composés trouvés dans les très jeunes feuilles, diffèrent généralement de ceux rapportés dans la littérature pour les graines en ce qui concerne les populations étudiées. Les endophytes participent-ils à la synthèse de ces substances mises en évidence dans les feuilles ? Le chapitre suivant répondra à cette question.

CHAPITRE II

ETUDE DES MICROORGANISMES
ENDOPHYTES DES FEUILLES DE

Coffea sp. A 315

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE II ETUDE DES MICROORGANISMES ENDOPHYTES DES FEUILLES DE *Coffea sp* A 315

INTRODUCTION

La majorité des plantes étudiées dans les écosystèmes naturels sont infestées par des microorganismes. Dans la dernière décennie, diverses microflores endophytes, les champignons (REDLIN et CARRIS, 1996; ARNOLD et *al.*, 2000) et les bactéries (STURZ et *al.* 2000, WEIDNER et *al.*, 2000 ; GARBEVA et *al.*, 2001), ont été isolés dans plusieurs parties asymptomatiques des plantes (feuilles, tiges, graines).

II-A ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II-A-1 DEFINITION

L'origine étymologique du mot "endophyte" provient du grec "endo" qui signifie "dedans" et "phyton", "plante", à l'intérieur de la plante.

Les endophytes sont des microorganismes (bactéries et champignons) qui peuvent coloniser et survivre à l'intérieur des tissus d'une plante apparemment saine (SINCLAIR et CERKAUSKAS, 1996; BACON et WHITE, 2000), contrairement aux épiphytes qui se développent à la surface externe.

Si en 1977, Wilson a considéré les associations bénéfiques de diverses champignons-racines (mycorhizae), ultérieurement, il a suspecté des associations champignons-feuilles qu'il a dénommé "mycophyllae". Les endophytes fongiques sont trouvés particulièrement dans presque toutes les parties de la plante (PETRINI 1991; STONE et *al.*, 2000).

II-A-2 MODE DE TRANSMISSION

Il existe deux types de transmission pour les endophytes :

- ✓ La transmission verticale, c'est-à-dire que les endophytes sont initialement contenus dans la graine et se retrouvent plus tard dans les différentes parties de la plante après la germination (Ex: cas des Ascomycètes dont le genre *Claviceps*, endophytes d'herbe).

- ✓ La transmission horizontale, c'est-à-dire que les spores de champignon emportées par le vent ou la pluie se déposent sur les parties aériennes et les racines de la plante, pénètrent à travers les stomates ou en forment des appressoria (organes de fixation et de germination des spores) et colonisent finalement l'intérieur de la plante (cas des endophytes du cacaoyer).

II-A-3 INTERACTION ENTRE PLANTES ET ENDOPHYTES

Les interactions entre plante hôte et microorganisme sont très variées, allant d'un simple commensalisme (DECKERT et *al.* 2001) à la relation mutualistique puis du commensalisme au parasitisme de manière continue (JOHNSON, et *al.*, 1997 ; REDMAN, et *al.* 2002). Il est probable que les endophytes peuvent devenir parasites sous certaines conditions et vice versa (MÜLLER et KRAUSS, 2005 ; SCHULZ et BOYLE, 2005).

Cependant, ces microorganismes sont différents des parasites dont le rôle principal est d'engendrer des maladies et de réduire l'appétit et la résistance de leurs plantes hôtes (KARL-HEINZ et *al.*, 2006). Les maladies, provenant de cette interaction, peuvent être considérées comme un statut déséquilibré d'une symbiose.

II-A-3-1 LE STATUT D'EQUILIBRE PLANTE-ENDOPHYTE

Le commensalisme et le mutualisme représentent les étapes équilibrées d'interactions des plantes-microorganismes.

II-A-3-1-1 Le commensalisme

Le commensalisme est bénéfique pour l'endophyte qui perçoit un abri et une provision d'éléments nutritifs et que sa présence à l'intérieur d'un tissu hôte ne provoque aucun dérangement.

II-A-3-1-2 Le mutualisme

Le mutualisme, par contre, est défini comme une interaction bénéfique pour les deux partenaires. En plus des avantages pour l'endophyte, le mutualisme est fréquemment considéré comme des résultats encouragés par l'hôte car la plante perçoit aussi des éléments nutritifs et des molécules de défense contre les phytopathogènes (WALLER *et al.*, 2005)

II-A-3-2 QUELQUES AVANTAGES

Les effets bénéfiques pour la plante peuvent résulter d'une provision améliorée d'éléments nutritifs apportés par l'endophyte. Par exemple, la symbiose entre les mycorhizes et les arbres est la plus étudiée dans l'interaction de plantes-microorganismes MFA (Mycorhize Fongique Arbusculaire) (HARRISON, 2005).

En plus de l'approvisionnement en éléments nutritifs et minéraux, les endophytes peuvent améliorer aussi la tolérance aux stress abiotiques et biotiques. Les endophytes des feuilles, l'espèce *curvularia*, par exemple, confèrent à l'herbe *Dichantheium* une adaptation à la chaleur extrême (REDMAN et al., 2002). Ils peuvent aussi conférer une tolérance à la sécheresse (WEST, 1994) et une amélioration de la croissance végétative (POTER et al. 1979).

De plus, les symbiotes peuvent augmenter la résistance contre les pathogènes. Ceci est observé chez les racines (COLDITZ et al. 2005), c'est aussi le cas des divers ASCOMYCETES, endophytes des feuilles (ARNOLD et al. 2003). Ces avantages résultent en partie de la production d'alcaloïdes par les champignons qui peuvent rendre la plante toxique aux herbivores et aux pathogènes (CLAY, 1990 ; CLAY et SCHARDL, 2002). Un rapport récent a montré l'évidence de régulation de réponses de la défense systémique par les endophytes: les BASIDIOMYCETES, endophytes de la racine de *Piriformospora indica* rehausse la résistance de l'orge non seulement à la nécrotrophie des racines parasitées, mais aussi au biotrophisme de *Graminis blumeria* pathogène (WALLER et al. 2005).

Les champignons endophytes sont des sources de nouvelles molécules (Li et al. 2001). Par exemple, les endophytes isolés chez les plantes brésiliennes ont montré une production d'**acide guignardique**, un nouveau métabolite secondaire (RODRIGUES et al., 2001), produit par un certain *Guinardia sp.* Ce genre a été aussi isolé dans les feuilles de *Citrus roostocks* (WELINGTON et al., 2001). Un champignon endophyte, *Colletotrichum sp.* isolé des feuilles de l'*Artemisia annua* produit l'**acide 6-isoprènylindole-3-carboxylique** (HONG et al., 2000), un nouveau métabolite secondaire.

II-A-4 ILLUSTRATION D'UNE COLONISATION PAR UN CHAMPIGNON ENDOPHYTE

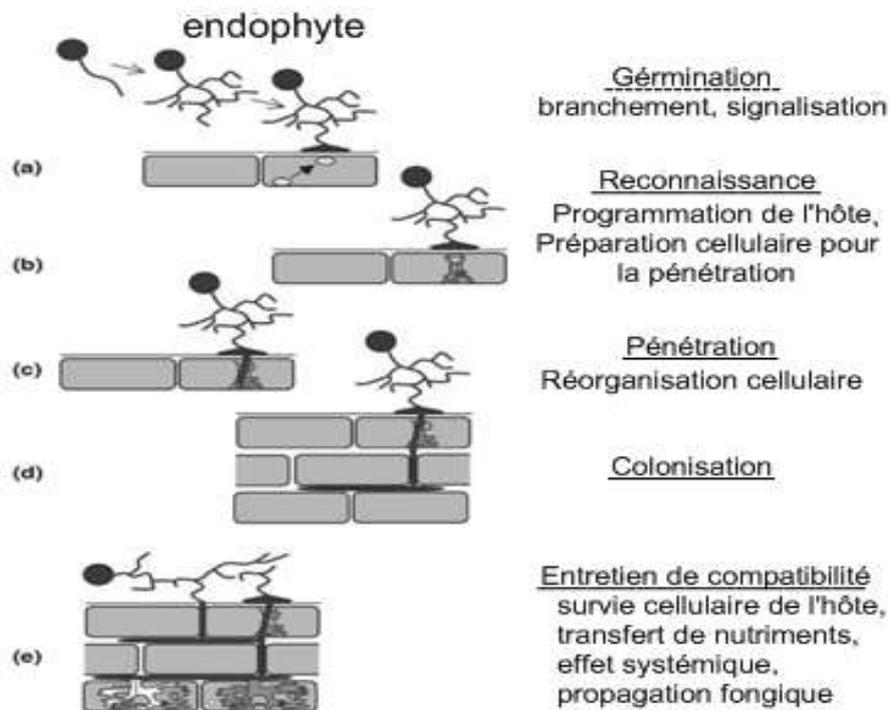


Figure 16: Développement symbiotique d'endophytes fongiques
(Source: AKIYAMA et al., 2005)

- (a) Une fois que les spores germent et approchent un appareil végétatif de l'hôte, la dominance apicale est abandonnée et le branchement d'hyphes est déclenché par le 5-désoxy-strigol (AKIYAMA et al., 2005)
- (b) Dès le premier contact physique, le champignon forme un appressorium qui paraît induire le mouvement du noyau de la plante vers le site du contact (AKIYAMA et al., 2005).
- (c) Les éléments cytosquelettiques et le réticulum endoplasmique forment l'appareillage de la pré-pénétration le long de l'axe du mouvement nucléaire (GENRE et al., 2005).
- (d) Quand le mycète atteint finalement le cortex intérieur, il pénètre la paroi cellulaire et forme une structure hyphale (comme un réseau filamenteux).
- (e) la colonisation des tissus commence. L'infection initiale est accompagnée par une induction équilibrée de gènes de la défense de la plante.

MATERIELS ET METHODES

II-B MATERIELS ET METHODES

II-B-1 MATERIELS

II-B-1-1 MATERIEL VEGETAL

Les feuilles des *Mascarocoffea* de *Coffea sp A315*, servent de matériel d'étude. Cette espèce renferme le plus des métabolites secondaires particuliers du groupe de *C. A315*. Elles sont récoltées des jeunes pieds des plantules en serre.

II-B-1-1-1 Pépinière des caféiers

Les multiplications par semis et par bouturage en serre sont choisies afin de pouvoir récolter des feuilles saines et fraîches pour l'étude des endophytes.



Figure 17: Pépinière des caféiers

II-B-1-1-2 Culture de caféiers par semis

Les graines des cafés sont récoltées dans la station de collection des *Mascarocoffea* de FOFIFA à Kianjavato au mois de Février.

Le semis est la méthode la plus classique de multiplication des caféiers. Après le traitement préparatoire (récolte, fermentation), les graines sont dépulpées puis débarrassées de leurs téguments (enveloppe dure et rigide qui encapsule la graine). Elles sont ensuite placées

sur un coton hydrophile imbibé d'eau dans une boîte de pétri. Les boîtes sont placées en serre en attendant que les premières feuilles cotylédonaires apparaissent.

Les températures moyennes influent sur la vitesse de développement des jeunes plants qui déploient leurs feuilles cotylédonaires, 1 à 2 mois après le semis. A ce stade, ils peuvent être repiqués en pots.

II-B-1-1-3 Bouturage

Le bouturage est préférentiellement utilisé en multiplication industrielle, notamment à Madagascar, pour la vulgarisation de variétés sélectionnées. Seuls les axes caulinaires semi-aotés et feuillés s'enracinent avec une bonne reprise. Après repiquage en pots contenant de la terre stérile, l'enracinement des boutures des caféiers est obtenu après environ 2 à 3 mois.

II-B-1-2 MILIEUX DE CULTURE (Cf. annexe IV)

Pour les champignons, 5 sortes de milieux de culture sont utilisées: DYPA (Dextrose Yeast Peptone Agar), OA (Oatmeal Agar), PDA (potato Dextrose Agar), PDB (Potato Dextrose Broth), PDB + jus de feuille de *C. A315*.

Pour les bactéries, les milieux NA (Nutrient Agar), eau peptonée et Agar simple sont utilisés.

II-B-2 METHODES

II-B-2-1 PREPARATION DES FEUILLES

II-B-2-1-1 Prélèvement des feuilles

Les feuilles sont prélevées des plantules cultivées en serre. Elles doivent être apparemment saines, c'est-à-dire qu'elles ne doivent présenter aucun signe de maladie quelconque (jaunisse, flétrissement, rouille), ni blessures.

II-B-2-1-2 Désinfection en surface

La désinfection en surface consiste à éliminer les microorganismes qui tapissent la surface du limbe. Ces microorganismes externes sont considérés comme des épiphytes et des contaminants.

Dans ce processus, les feuilles triées sont lavées délicatement avec de l'eau savonneuse, puis rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile.

La suite des opérations se déroule sous hôte à flux laminaire préalablement nettoyée, désinfecté et stérilisée au moyen d'une lampe à UV.

Les feuilles préalablement rincées, sont immergées dans de l'alcool 70% pendant environ 30 secondes. La désinfection se poursuit encore par l'immersion des feuilles dans de l'hypochlorite de calcium 3% pendant 10 minutes, puis de nouveau dans l'alcool 70% pendant 30 secondes. La désinfection en surface se termine par le rinçage 4 fois avec l'eau distillée stérile.

Les très jeunes feuilles ne supportent pas l'alcool et se mettent à faner immédiatement. Par conséquent, il est préférable de choisir les feuilles entre le deuxième et le quatrième nœud.



Figure 18: Manipulation sous hotte à flux laminaire

Toutes les manipulations ultérieures sont faites auprès d'un bec bunsen (20 cm) sous hotte à flux laminaire (Fig. 18). Les désinfectants (eau savonneuse, hypochlorite de sodium et alcool) sont utilisés pour éviter les risques de contamination venant de l'extérieur.

II-B-2-1-3 Vérification du procédé de désinfection en surface

Pour vérifier le procédé de désinfection en surface, 100 μ l de la dernière eau de rinçage sontensemencés en nappe sur le milieu de culture normal (sans additifs antifongiques ou

antibiotiques). Après une incubation, à la température 25°C pendant 2 à 7 jours, si aucune colonie ni mycélium ne pousse, le procédé est validé.

II-B-2-2 CULTURES MICROBIENNES

II-B-2-2-1 Mise en culture

Les feuilles sont découpées en explants de 2 mm de côté. Elles sont ensuite déposées sur le milieu gélosé à raison de 7 à 8 explants par boîte (boîtes de pétri de 90 mm) ou 15 explants par boîte (boîtes de pétri de 125 mm). Chaque explant est distant de 3 cm l'un de l'autre pour que les colonies qui y émergent n'envahissent pas la culture. Au total, soixante quinze (75) explants sont repartis sur le milieu de culture DYPA et autant pour les bactéries, sur le milieu NA.

L'antifongique, la nystatine est incorporée dans le milieu NA à raison de 1 µ/ml. L'antibiotique, le chloramphénicol est ajouté dans le milieu DYPA à raison de 5µg/ml,

L'incubation s'effectue à 25°C pendant 2 à 7 jours. Les cultures sont observées quotidiennement.

II-B-2-2-2 Isolement

Si une colonie ou mycélium émerge un explant, ce/cette dernier(e) est prélevé(e) avec un morceau de gélose et repiqué(e) directement sur un autre milieu pour ne pas envahir toute la boîte.

Une colonie bactérienne est caractérisée par observation macroscopique (couleur, contour, aspect, relief, consistance, transparence, taille), puis repiquée sur un nouveau milieu de culture (sans addition d'antifongique).

Les champignons sont aussi repiqués directement sur des nouveaux milieux (sans antibiotiques).

II-B-2-2-3 Purification

La purification consiste à repiquer successivement une colonie, préalablement caractérisée, sur les milieux solides.

II-B-2-2-4 Dénombrement des colonies

Le taux de colonisation d'une feuille par la population d'endophyte et la fréquence d'isolement d'un individu (FI) peut se calculer selon les formules suivantes (PETRINI et al., 1982):

$$\text{Taux de colonisation} = \frac{\text{Nombre de segment avec endophyte}}{\text{Nombre total de segments inoculés}} \times 100$$

$$FI = \frac{\text{Nombre d'isolement d'un taxon}}{\text{Nombre total de segments inoculés}} \times 100$$

II-B-2-3 IDENTIFICATION

I-B-2-3-1 Identification des bactéries

Les cultures pures sont soumises à des tests d'identification macroscopique et microscopique tout en se référant à des bases de données bibliographiques, des photothèques et des tests biochimiques complémentaires, spécialement pour les bactéries.

II-B-2-3-1-1 Observation macroscopique

L'observation macroscopique est une technique utilisée en microbiologie pour qualifier une souche microbienne. Les caractères morpho-cultureux sur un milieu de culture solide sont étudiés (couleur, contour, relief, consistance, transparence, aspect de la surface et taille).

II-B-2-3-1-2 Observation microscopique

L'observation microscopique est utilisée pour étudier les individus formant une colonie d'une souche bactérienne pure.

a) Observation à l'état frais

L'observation à l'état frais est utilisée en bactériologie pour observer le mode de déplacement et de division cellulaire. La préparation d'une colonie bactérienne est montée entre lame et lamelle en utilisant l'eau distillée stérile comme solution d'étalement.

Les bactéries mobiles se déplacent le long du champ de l'observation d'une direction quelconque (droite, zigzag, onduleuse ...) tandis que celles qui sont immobiles, en division, font des légers mouvements sur place.

b) Coloration Gram

La coloration Gram, utilisant des colorants spécifique (Cf. annexe III), permet de classer les bactéries en deux groupes: bactéries à Gram (+) et bactéries à Gram (-).

Une goutte d'eau distillée est versée sur la lame pour étaler une colonie bactérienne prélevée d'une culture pure. La préparation est ensuite fixée par chauffage (flamme du bec bunsen ou plaque chauffante). En effet, la fixation est indispensable car un frottis bien fixé persiste pendant le rinçage à l'eau.

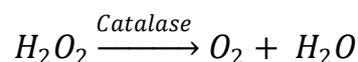
Les bactéries à Gram (+) se colorent en violet par le cristal violet même après la décoloration. Cependant, la paroi des bactéries à Gram (-) ne fixe pas le cristal violet et se décolore par le lavage utilisant le mélange alcool-cétone (V/V). Après une recoloration à la fuchsine les bactéries à Gram (-) se colorent en rose.

II-B-2-3-1-3 Test biochimique

a) Recherche de catalase

La catalase est une enzyme qui scinde une molécule de peroxyde d'hydrogène en une molécule d'oxygène et une molécule d'eau.

Sur une lame contenant une préparation bactérienne, l'addition d'une goutte d'eau oxygénée provoque un dégagement de molécules d'O₂ qui se traduit par une formation des petites bulles d'airs (LARPENT et LARPENT, 1997).



b) Respiration

Un volume de 5ml de gélose molle est versé dans un tube à essai de 8 cm³. Après la stérilisation, le milieu est laissé se refroidir en culot. L'inoculum bactérien est ensemencé par une pique verticale jusqu'à 1 cm du fond du tube. L'anse est ensuite retirée en faisant un légère strie vers l'ouverture. L'incubation dure 24 heures à 25°C.

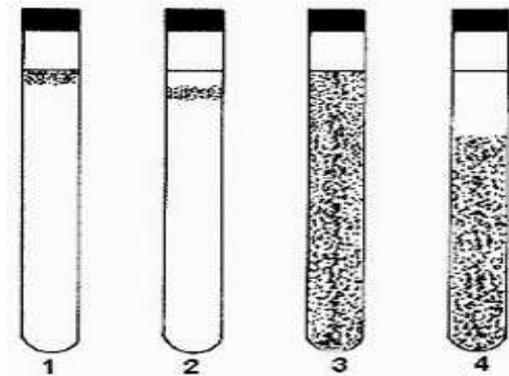


Figure 19: Comportement bactérienne vis-à-vis de l'oxygène

- 1- Les bactéries aérobies strictes ne se développent qu'en présence d'oxygène.
- 2- Les bactéries micro-aéro-tolérantes se développent mieux lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air.
- 3- Les bactéries aéro-anaérobies facultatives se développent avec ou sans oxygène.
- 4- Les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en absence totale d'oxygène.

c) Croissance à 4°C

Les souches sont repiquées sur milieu NA, puis incubées à la température de 4°C. Le test est positif si les bactéries peuvent se développer normalement à cette température.

d) Production d'indole

Les bactéries sont cultivées sur le milieu eau peptonée, réparti dans des tubes à essais stériles. Les tubes ainsi ensemencés sont incubés à 30°C pendant 18 à 24 heures. Pour la révélation, on verse quelques gouttes de réactif de Kovacs. Le développement d'un anneau rouge en surface dans les tubes indique la présence d'indole (MARCHAL *et al.*, 1991).

e) Test de fermentation et oxydation

Le milieu Hajna-Kligler (Cf. Annexe IV) est réparti en tube à essai en deux exemplaires et laissé se refroidir en culot. La colonie d'une souche bactérienne pure est ensemencée, à l'aide d'une anse préalablement stérilisée, par une simple piqure verticale. Après le repiquage, deux gouttes d'huile de paraffine stérile sont versés dans l'un des tubes à essai pour créer la condition anaérobie. Ceci est utilisé pour le test de fermentation tandis que l'autre tube (contenant du bromocrésol, indicateur coloré) est utilisé en tant que tel pour le test d'oxydation.

Lecture: Le test est positif si la couleur du milieu vire du vert au jaune. Elle reste inchangée si le test est négatif.

f) Test de sporulation

La plupart des bactéries produisent des spores (exemple, le genre *Bacillus*) pour résister aux conditions extrêmes du milieu de culture (manque de nourriture, accumulation de métabolites secondaires) qui conduit à un changement drastique du pH. Après la phase stationnaire, la disponibilité des facteurs de croissance fait défaut, les bactéries sporulent.

La culture en phase de déclin est alors prélevée à l'aide d'une micropipette puis étalée sur une lame. Après une fixation préalable, le frottis bactérien est coloré par le vert- malachite puis chauffé pendant 10 min pour que la coloration soit efficace. La préparation est ensuite rincée abondamment à l'eau. La deuxième coloration consiste à verser sur la préparation quelques gouttes de safranine O, pendant 30 secondes pour recolorer le frottis.

Les bactéries qui sporulent ont des endospores colorés en vert par le vert- malachite. Les bactéries qui ne le sont pas se recolorent en rouge par la safranine O.

II-B-2-3-2 Identification des champignons

II-B-2-3-2-1 Observation macroscopique

Après 5 jours d'incubation, le diamètre de chaque colonie de champignon est mesuré, la couleur de chaque colonie est notée.

Après 10 jours d'incubation, les mycéliums de la colonie fongique sont observés sous loupe binoculaire. L'organe de fructification est noté et dessiné pour confrontation avec la littérature.

II-B-2-3-2-2 Observation microscopique

L'observation microscopique des champignons consiste à étudier la morphologie d'une colonie mycéliale dans laquelle les pycnides, asques, zygospores, sclérotés, chlamydospores et basides sont identifiés.

Les spores, s'ils existent, (interne ou externe, thalique ou blastique, isolées ou en chaînette: phialospores, alieuspores, blastospores), ainsi que leurs dispositions (solitaire, chaîne, bouquet) sont observées.

Après les observations macroscopique et microscopique, il est possible d'essayer de rattacher chaque colonie aux grandes divisions auxquelles elle appartient: ASCOMYCETES, DEUTEROMYCETES, BASIDIOMYCETES, ZYGOMYCETES.

A l'aide de la clé dichotomique, une identification peut aller jusqu'à la détermination du genre.

II-B-2-4 CONSERVATION

II-B-2-4-1 Conservation des bactéries

Le milieu NA est utilisé pour la conservation des bactéries. Il est distribué en tube à essai et laissé se solidifier en culot (en position vertical). L'ensemencement de la souche à conserver se fait par une piqure centrale de la gélose au moyen d'une anse (MARCHAL *et al.*, 1991).

II-B-2-4-2 Conservation des champignons

Une colonie pure de champignon est repiquée dans un milieu de culture solide pauvre (OA), en tube, en gélose pente. Après 5 jours d'incubation, elle est susceptible d'être conservée sous huile de paraffine, ou eau distillée stérile pendant longtemps dans un endroit sombre à température entre 20 à 25°C.

II-B-2-5 CULTURE FERMENTATIVE

Beaucoup de produits de synthèse de microorganismes ne sont pas liés au métabolisme de base de la cellule productrice ; ces produits s'appellent «**métabolites secondaires**». Ces substances jouent des rôles importants, pour la plupart, car on les rencontre dans les usages thérapeutiques, stimulants, additifs alimentaires, etc...., La découverte de la pénicilline et d'autres antibiotiques et mycotoxines a ouvert un nouveau secteur large pour la microbiologie industrielle (HANS, 1990).

- Métabolites primaires: Ce sont les acides nucléiques, les acides aminés, les enzymes etc...., Ils sont produits lors de la TROPHOPHASE (phase de latence jusqu'à la fin de la phase exponentielle). Ils participent à la croissance cellulaire.
- Métabolites secondaires : Ce sont les antibiotiques, les mycotoxines et les composés phénoliques. Ils sont produits lors de l'IDIOPHASE (début de la phase stationnaire jusqu'à la phase de déclin). A la fin de la fermentation, ils sont récupérés par une simple centrifugation. Ils ne participent pas directement au développement de la cellule productrice.

L'extraction des métabolites secondaires des microorganismes est facilitée par la maîtrise de la fermentation pour les champignons, et la maîtrise de la cinétique de croissance pour les bactéries.

II-B-2-5-1 Fermentation bactérienne

II-B-2-5-1-1 Cinétique de croissance bactérienne

Les bactéries sont repiquées dans le Nutrient Broth (NB), milieu liquide. Le milieu est reparti à raison de 5 ml dans des tubes à essai de 12 ml auquel on ajoute une ansée de la colonie bactérienne. La préparation est incubée à 25°C pendant 24 heures. C'est la pré-culture.

La pré-culture est,ensemencée à raison de 10^5 cellules/ml dans un autre milieu. (La concentration bactérienne est connue au moyen du Densichek du Mc Farland, un appareil de mesure de la turbidité ou de la densité optique (DO) de la biomasse bactérienne : **DO = 0,5 Mc F ↔ 10^8 UFC**).



Figure 20: Appareillage de suivi de la cinétique de croissance bactérienne

L'appareillage (Fig. 20), est composé du densitométrique (gauche), muni d'un écran électronique où la valeur de la densité optique s'affiche, et d'une porte cuve comme les autres spectrophotomètres. Le vortex (centre), utilisé pour homogénéiser la suspension bactérienne à mesurer. Les suspensions bactériennes (droite), en tubes, prêtes pour la lecture.

La densité optique (DO) est mesurée toutes les heures permettant d'obtenir la courbe de cinétique de croissance bactérienne (Fig. 21): $\log(DO) = f(t)$.

Le suivi de la cinétique de croissance bactérienne permet d'avoir toutes les informations sur la croissance d'une souche donnée (phases de croissances, vitesse de croissance maximale, temps de génération G).

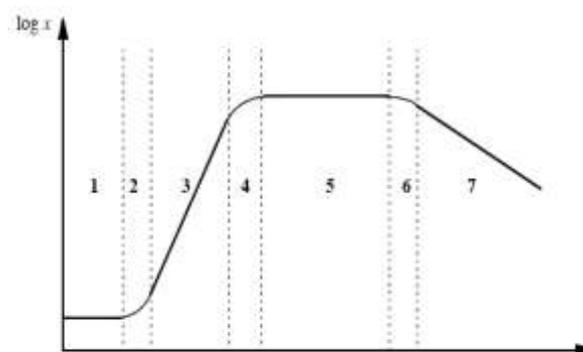


Figure 21: Courbe de croissance bactérienne et ses différentes phases (BUCHANAN 1918)

x représente la densité ou la biomasse de la culture ou DO. Les phases sont : (1) phase de latence, (2) phase d'accélération, (3) phase de croissance à vitesse constante, (4) phase de ralentissement, (5) phase stationnaire, (6) et (7) phase de déclin.

II-B-2-5-1-2 Processus de fermentation bactérienne

Les métabolites secondaires bactériens sont produits au début de la phase stationnaire. Ces substances sont produites en quantité très faible (1 à 20 mg/l). Connaissant les cinétiques de croissance de ces bactéries, il est alors préférable de pratiquer la fermentation de chaque

souche à grande échelle. Il s'agit d'une fermentation suivant la condition de la « culture en batch » ou discontinue.

Le milieu NB est distribué en raison de 50 ml dans des récipients de 200 ml. Chaque souche bactérienne, issue d'une pré-culture, estensemencée dans le milieu à une concentration de 10^5 cellules/ml. Les récipients sont fermés hermétiquement. Le petit volume d'air atmosphérique résiduel de récipient sera utilisé par les microorganismes pour la croissance de la biomasse microbienne. L'incubation se fait à 25°C. La fermentation est arrêtée, après que la phase stationnaire est atteinte, par l'ajout d'acétate de plomb 1M, puis congélation à une température de moins 30°C.

II-B-2-5-2 Fermentation fongique

Des carrés de côté de 0,5 cm à quatre exemplaires de mycélium sont découpés à partir des souches des champignons. Ces morceaux sont placés dans un récipient de 200 ml contenant 50 ml de milieu de culture liquide stérile.

Deux types de milieu sont utilisés: le Potato Dextrose Broth (PDB) normal et le PDB + jus de feuille de *C. A315* (10 g/l), pour créer l'environnement naturel de ces champignons endophytes des feuilles. La culture est incubée à l'ombre et à la température ambiante (environ 25°C) pendant 8 semaines dans une condition anaérobie. Pour chaque souche de champignon, 4 cultures fermentatives sont effectuées: 2 sur milieu liquide PDB normal et 2 sur le milieu PDB + jus de feuille.

Les cultures sont remuées légèrement chaque jour pour que les mycéliums se dispersent et se développent rapidement dans le milieu.

II-B-2-6 EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES DES MICROORGANISMES ENDOPHYTES DE FEUILLES DE *C. sp A315*

Ces métabolites secondaires sont sécrétés dans le milieu de culture ou emmagasinés dans la cellule bactérienne ou dans les hyphes de champignon. L'extraction de ces métabolites secondaires sont les mêmes pour les bactéries que pour les champignons. Il s'agit d'une extraction hydroalcoolique à froid. Le volume résiduel de surnageant issu de la fermentation est additionné d'alcool jusqu'à une proportion de 70/30 (V/V).

Les surnageant bactériens sont soumis directement à l'ultrason pendant 30 min tandis que les mycéliums de champignon sont d'abord filtrés, puis broyés. Après une macération durant 3 jours, les surnageants microbiens sont filtrés.

L'alcool est ensuite éliminé (Rotavapor de marque BUCHI, RE) à 30°C. La fraction aqueuse résiduelle est centrifugée à 14 000 tr/min, et le surnageant, noté **P₁** est récupéré.

Les protéines et les substances colloïdales sont précipitées par les réactifs de CARREZ (Cf. Annexe II), puis éliminées par une filtration, puis on a la fraction aqueuse, notée **P₂**.

La fraction aqueuse **P₂** est concentrée (étuve ventilée à la température 30°C pendant 24 heures) pour avoir la fraction aqueuse **P₃** concentrée.

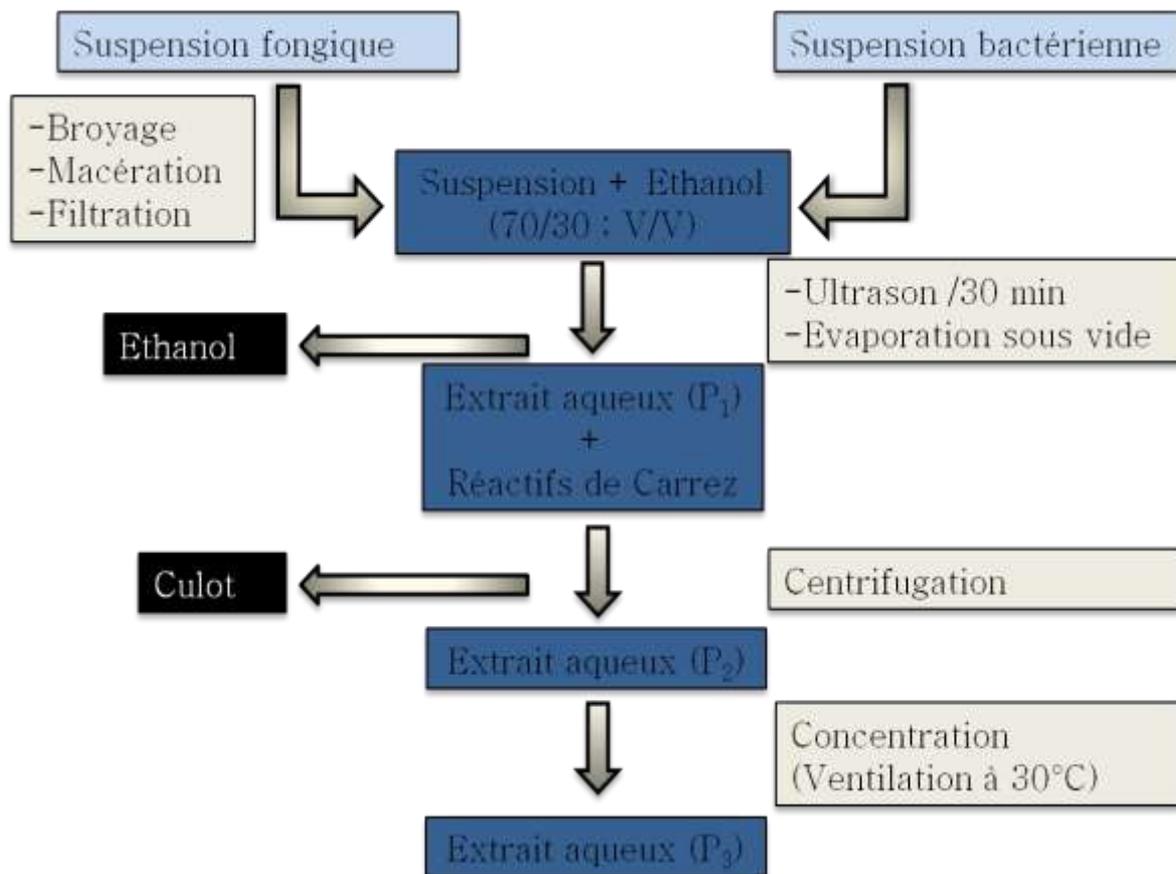


Figure 22: Schéma récapitulatif de l'extraction des métabolites secondaires des microorganismes endophytes

II-B-2-7 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Principe et mode opératoire sont ceux des paragraphes I-B-2-4-1 et I-B-2-4-2, page 23

RESULTATS ET DISCUSSION

II-C RESULTATS ET DISCUSSION

II-C-1 LES BACTERIES ENDOPHYTES

Dix sept (17) bactéries endophytes des feuilles de *C. sp A315* ont été isolées. Après la purification et les tests d'identification, 8 types souches ont été considérés être des bactéries endophytes des feuilles de *C. A315*. Les résultats sont résumés dans les tableaux 4, 5 et 6.

Ainsi: 5 cocci à gram (-), 3 bacilles, B1 et B7 à gram (-) ainsi que B8 à gram (+), ont été identifiés selon l'observation microscopique et morpho-cultureux (Tab. 5, page 51). La souche B7 est un *Pseudomonas* (fluorescence verdâtre) tandis que les 7 autres ne sont pas caractérisées. Les colonies sont toutes de couleur blanche à blanchâtre. Elles sont aérobies strictes exceptées 2 souches B2 et B6 qui sont aérobie-anaérobie facultative ; à indole négatif, sporulantes (excepté B2, B7 et B8) ; à catalase (+) et oxydase (+), (sauf B2 et B6) et qui ont une croissance à 4°C (Tab. 6, page 51).

Le taux de colonisation de ces populations bactériennes de feuilles de *C. A315* est de 22,7%. (Tab. 4). C'est la bactérie B2 qui a la fréquence d'isolement la plus élevée, avec FI = 8%, suivie par la bactérie B4, FI = 5,33% et B1, avec FI = 2,7% tandis que les bactéries B3, B5, B6, B7 et B8 ont la même FI basse égale à 1,37%.

II-C-1-1 DENOMBREMENT DE COLONISATION

Le dénombrement de la colonisation des endophytes bactériennes (Tab. 4) des feuilles de *C. A315* est obtenu selon les équations de PETRINI et ses collaborateurs (1982).

Tableau 4: Dénombrement des bactéries endophytes

Types	Nombre d'isolement	Nombre de segment inoculé	Fréquence FI (%)
B1	2	75	2,7
B2	6		8
B3	1		1,37
B4	4		5,33
B5	1		1,37
B6	1		1,37
B7	1		1,37
B8	1		1,37
Total	17	Taux de colonisation (%)	22,7

II-C-1-2 OBSERVATION MORPHOCULTURALE

Tableau 5: Observations macroscopiques et microscopiques des bactéries

Types	Observation macroscopique							Observation microscopique				
	Couleur	Contour	Aspect	Relief	Consistance	Transparence	Diamètre (mm)	Mobilité	Forme	regroupement	Gram	Taille μm
B1	Blanche	Rond	Rugueux	Semi-bombé	Crémeuse	Opaque	2.5	(-)	Bacille	2 à 2	(-)	L : 2 l : 1
B2	Blanchâtre	Ovale	Lisse	Semi-bombé Surbaissé	Muqueuse	Transparente	2	(-)	Coccie	Chaîne	(-)	1
B3	Blanchâtre	Ovale	Lisse	Bombé	Muqueuse	translucide	6	(-)	Coccie	Chaîne	(-)	0.7
B4	Blanche	Plurilobés	Rugueux	Plat	Sèche	Opaque	5	(-)	Coccie	Chaîne	(-)	1
B5	Blanche	Ovale	Rugueux	Plat	Crémeuse	Opaque	3.5	(-)	Coccie	Grappe	(-)	0.6
B6	Blanchâtre	Décheté	Rugueux	Plat	Crémeuse	Opaque	4	(-)	Coccie	Chaîne	(-)	0.6
B7	Blanchâtre	Rond	Lisse	Semi-bombé	Muqueuse	Transparente fluorescente	1.7	(-)	bacille	Chaîne	(-)	L : 2 l : 1
B8	Blanchâtre	Rond	Rugueux	Semi-bombé	Muqueuse	Transparente	2	(+)	Bacille	Isolé	(+)	L=2,5 l = 1

II-C-1-3 TESTS BIOCHIMIQUES

Tableau 6 : Résultats de tests biochimiques

Types	Respiration	Catalase	Oxydase	Croissance à 4°C	Oxydation /Fermentation	Indole	sporulation
B1	Aérobie stricte	(+)	(+)	(+)	Oxydative	(-)	(-)
B2	Aérobie anaérobie facultative	(+)	(-)	(+)	Fermentative	(-)	(+)
B3	Aérobie stricte	(+)	(+)	(+)	Oxydative	(-)	(+)
B4	Aérobie stricte	(+)	(+)	(+)	Oxydative	(-)	(+)
B5	Aérobie stricte	(+)	(+)	(+)	Oxydative	(-)	(+)
B6	Aérobie anaérobie facultative	(+)	(-)	(+)	Fermentative	(-)	(+)
B7	Aérobie stricte	(+)	(+)	(+)	Oxydative	(-)	(-)
B8	Aérobie stricte	(+)	(+)	(+)	Oxydative	(-)	(+)

II-C-1-4 CINETIQUES DE CROISSANCE

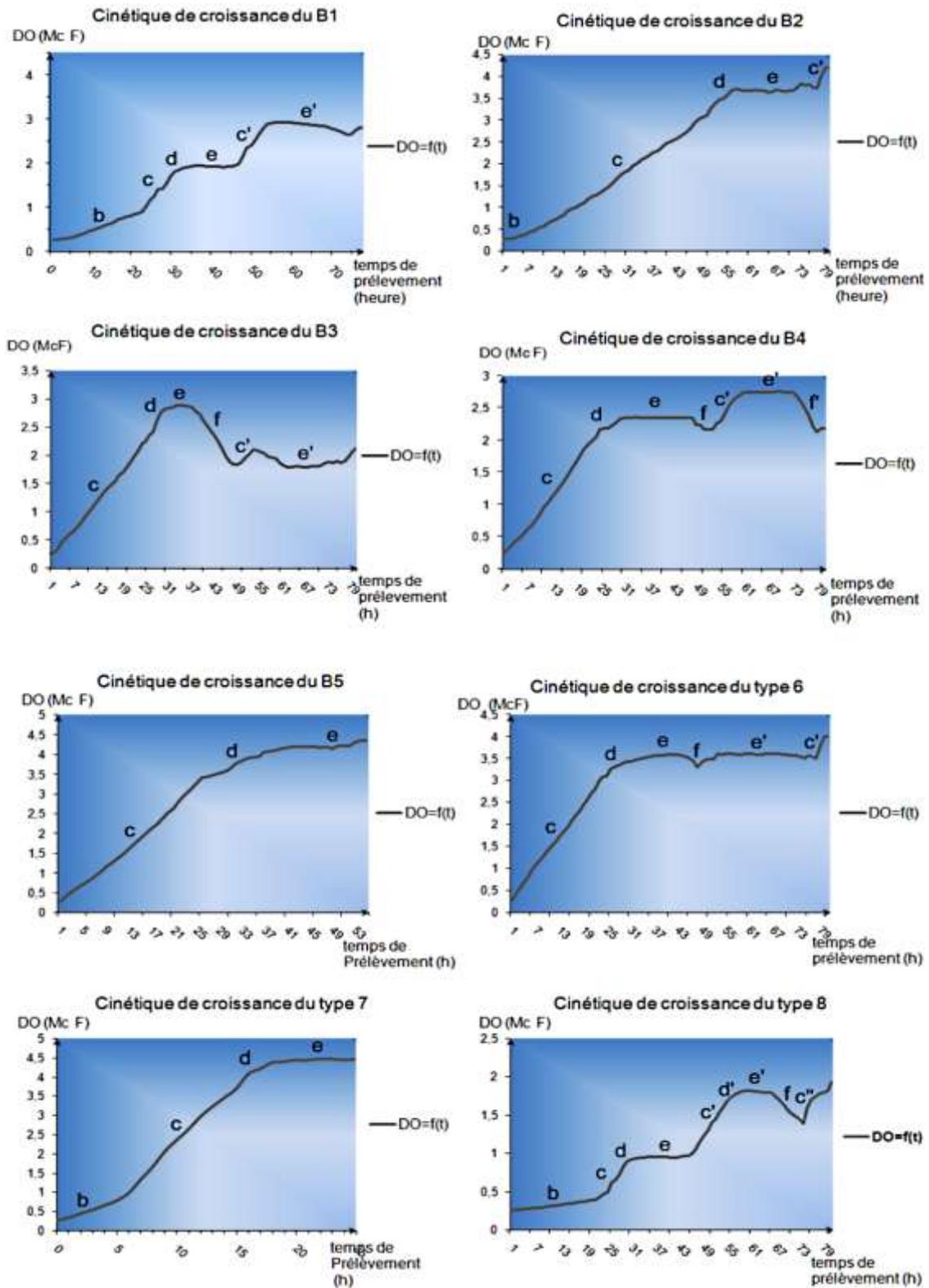


Figure 23: Cinétique de croissance des bactéries, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 et B8.

Une courbe de croissance est exprimée en $DO=f(t)$, DO en Mc Farland (McF) ; le temps en heure (h). Une courbe est constituée par différentes phases dans laquelle on trouve:

- La phase de latence ou phase d'adaptation, notée (a), absente sur toutes les courbes car la cinétique a été précédée d'une pré-culture de 24 heures.
- La phase d'accélération, notée (b), est présente seulement chez les bactéries B1, B2, B7 et B8. Dans cette phase, les bactéries commencent à s'adapter dans le milieu et s'y développe petit-à-petit.
- La phase exponentielle, notée (c), est présente dans toutes les courbes de cinétique. C'est le moment où tous les individus bactériens se divisent activement et que la croissance maximale est atteinte. Le temps de génération (G), est la vitesse de croissance maximale (μ_{max}) peuvent se calculer dans cette phase.
- Par contre, (c') se trouve aussi dans les courbes de cinétiques de croissances des bactéries B1, B2, B3, B4, B6 et même (c'') chez B8. La portion (c') est aussi une phase exponentielle qui se produit juste après une phase stationnaire. Les métabolites secondaires produits pendant la phase stationnaire sont utilisés comme substrat par ces bactéries, ce qui explique l'existence de (c').
- La phase de décélération, notée (d) et (d'), se produit, au moment où les substrats commencent à être épuisés ce qui ralentit la croissance.
- les métabolites secondaires ainsi que des résidus de substrats toxiques s'accumulent pendant la phase stationnaire, notée (e) et (e'). Le milieu n'est plus favorable pour les bactéries.
- La phase de déclin, (f), se produit après (e). Les bactéries sont détruites suite au phénomène d'autolyse cellulaire.

II-C-2 LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

II-C-2-1 OBSERVATION MACROSCOPIQUE ET DENOMBREMENT

Quarante colonies (40) de champignons endophytes des feuilles ont été isolées chez *C. sp A315*. Des doublons ont été repérés et éliminés après la caractérisation macroscopique. Les 40 champignons sont alors regroupés en 21 souches types (Tab 7, page 54).

Parmi ces 21 souches des champignons endophytes isolées des feuilles de *C. A315*, le champignon T17 (apparu après 5 jours d'incubation, de couleur grisâtre et de diamètre 3 cm après 5 jours), est le plus fréquent avec la fréquence d'isolement, FI = 6,67% puis T1 et T2 avec la même FI = 5,33%.

Le taux de colonisation est de 53,33% pour les champignons endophytes des feuilles de *C. A315* (Table 7). Cette valeur est significative par rapport à celle des endophytes de *Euterpe oleracea* (21 à 30%), un palmier du Brésil (RODRIGUES, 1994).

Tableau 7: Observation macroscopique de champignon et dénombrement de leurs colonies

Observation macroscopique				Dénombrement de la colonisation		
Types	Couleur	Diamètre après 5 jours (Cm)	Moment d'apparition (jours)	Nombre d'isolement	Nombre de segment inoculé	Fréquence d'isolement (%)
T1	Rose blanche	4	3	4	75	5,33
T2	blanche	3		4		5,33
T3	Gris-blanc	6		1		1,33
T4	Blanche	6		1		1,3
T5	Noir	3		2		2,67
T6	blanche	5		1		1,33
T7	Gris-blanc	3		1		1,33
T8	Rose-blanche	5		2		2,67
T9	blanche	6	4	3		4
T10	blanche	3		2		2,67
T11	Grisâtre	6		1		1,33
T12	Jaunâtre	4		3		4
T13	Blanche	3	5	1		1,33
T14	Grisâtre	3		1		1,33
T15	grise	3		2		2,67
T16	blanche	5		1		1,33
T17	Grisâtre	3		5		6,67
T18	Noire	3		1		1,33
T19	Grise	3		2		2,67
T20	Verdâtre	6		1		1,33
T21	Vert-gris	6	11	1		1,33
			Total	40	Taux de colonisation	53,33%

II-C-2-2 IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

Les 21 champignons endophytes sont regroupés en 10 genres après leur observation microscopique (Cf. Annexe V). Deux *Rhizoctonia sp* (Types 1 et 13), trois *Verticillium sp* (Types 2, 7 et 12), un *Cladosporium* (Type 3), un *Colletotrichum sp* (Type 4), deux *Corticium* (Types 5 et 9), un *Gliocladium sp* (Type 6), un *Botrytis pers* (Types 20), cinq *Helminthosporium* (Type 8, 10, 14, 18 et 16) et deux *Penicillium* (Types 21 et 22), un *Pillularia Berkh* (T15) et deux autres à identifier (Fig. 24).

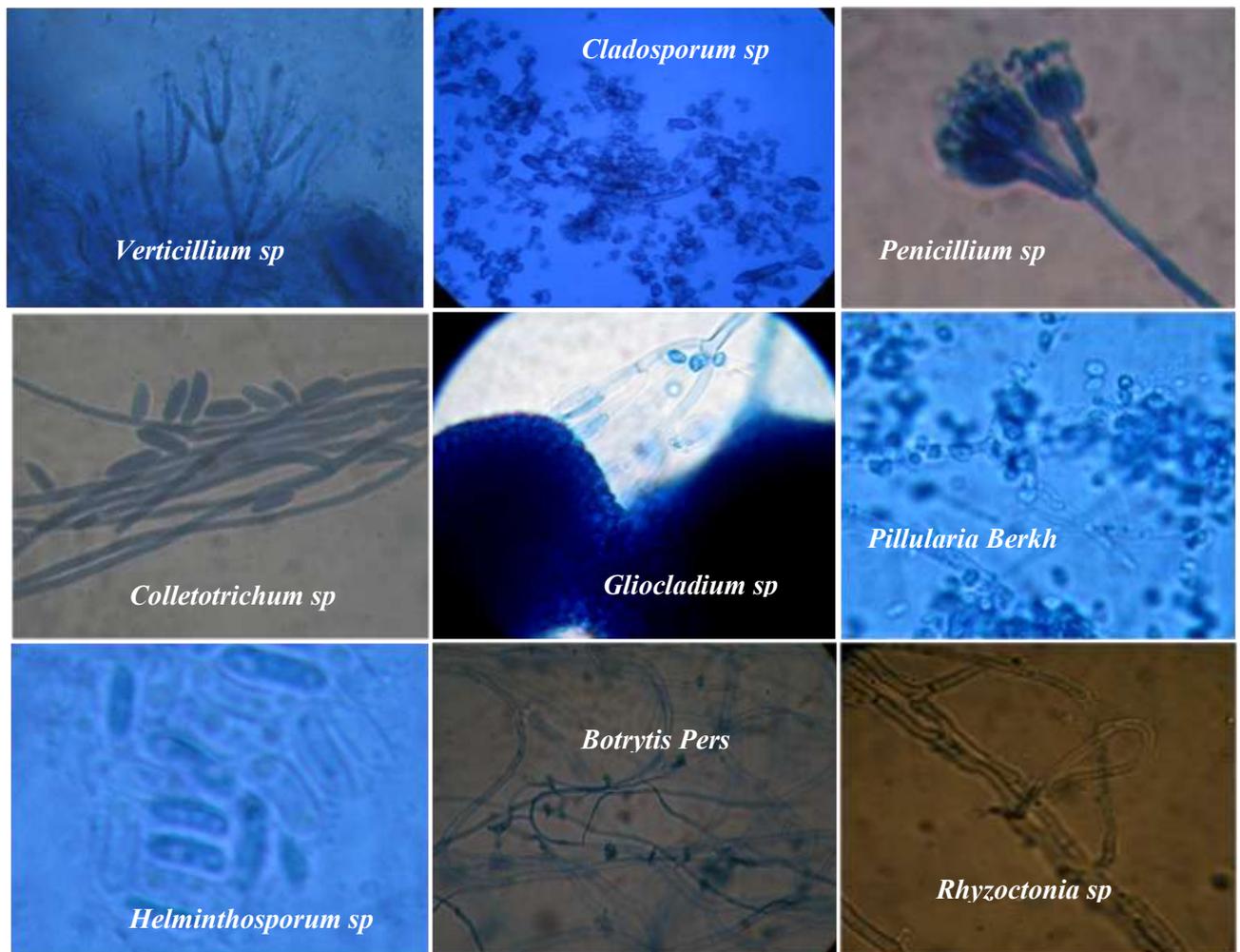


Figure 24: Champignons endophytes de feuille de *C. sp* A315 (source auteur)

II-C-3 LES METABOLITES SECONDAIRES

II-C-3-1 CROISSANCE ET FERMENTATION

Les milieux de culture utilisés permettent la croissance des microorganismes endophytes. On a constaté que les milieux ajoutés de jus de feuille (NB + jus de feuille pour

les bactéries et PDB + jus de feuille pour les champignons) sont les meilleurs pour la croissance de biomasse comparés aux milieux ordinaires (NB et PDB). Cependant, les milieux NB et PDB ordinaires fournissent une qualité de substance plus élevée et plus interprétable en CCM. C'est-à-dire que les milieux NB et PDB normaux sont favorables pour la production des métabolites secondaires que les milieux modifiés.

II-C-3-2 CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE CHAMPIGNON

Les figures Fig. 25 et 26, montrent les profils chromatographiques des extraits hydroalcooliques des champignons endophytes des feuilles de *C. sp A315*.

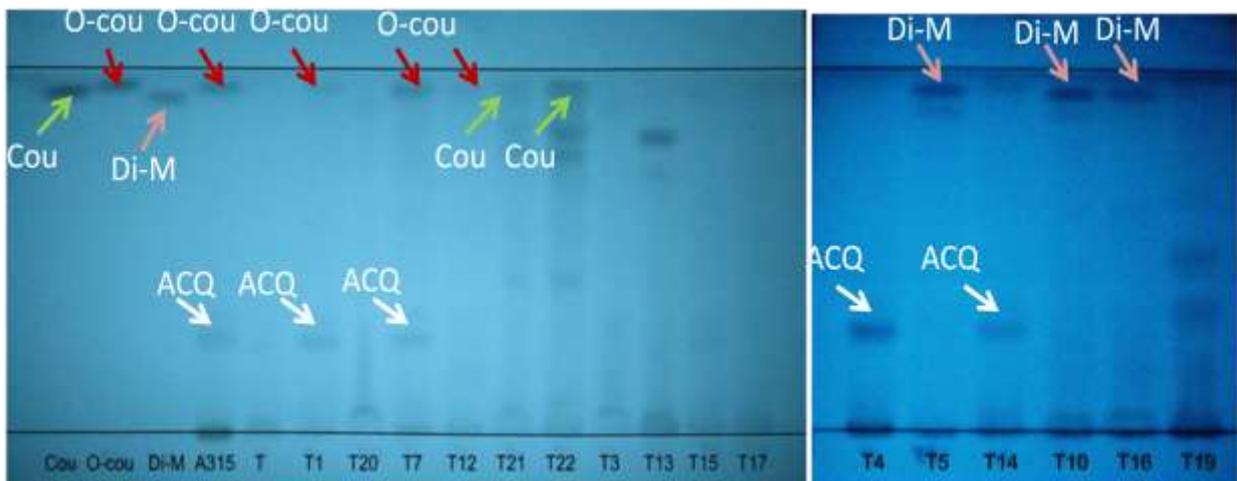


Figure 25: Chromatogramme des extraits issus de la fermentation fongique à 360 nm (solvant MFE)

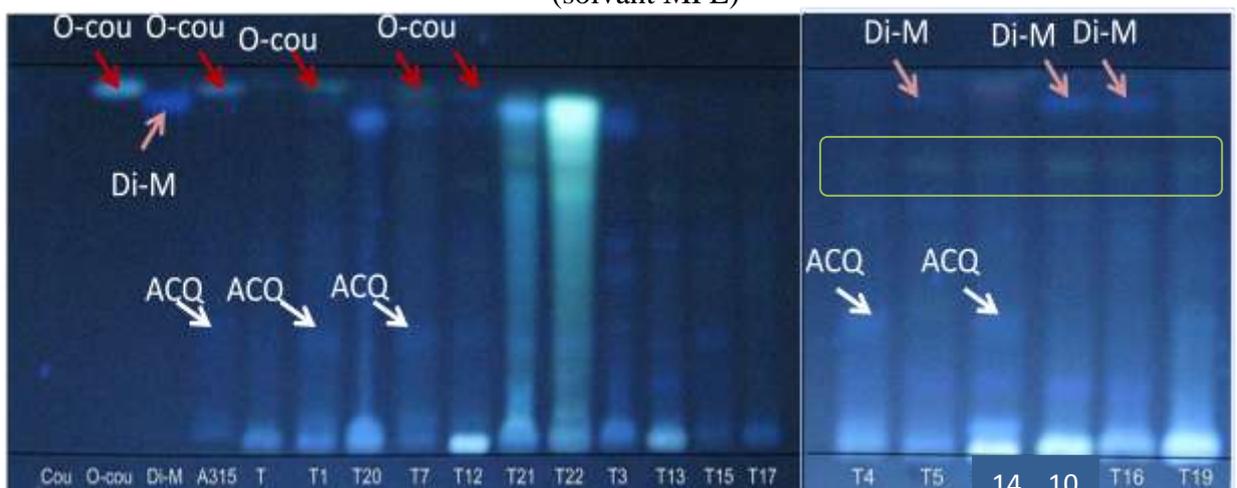


Figure 26: Chromatogramme des extraits issus de la fermentation fongique à 360 nm (solvant MFE)

Les spots à identifier sont nombreux dans le chromatogramme des extraits issus de la fermentation fongique. Cependant, nous ne disposons que quelques substances de référence. Il ne nous a pas été possible non plus de les identifier en CCM. Nous nous sommes alors contentés de déterminer seulement leur présence par rapport à celles présentes dans les feuilles de caféier.

Parmi les spots attribuables à des substances connues dans les chromatogrammes des extraits des champignons:

Les spots qui ont des $R_f = 0,25$ et $0,28$, fluorescent gris à 254 nm et bleu clair à 360 nm. Ils sont présents dans l'extrait de feuille de *C. A315* ainsi que chez les champignons endophytes T1 (*Rhizoctonia*) et T7 (*Verticillium*). Ces substances ont la même fluorescence que l'AC5Q. Comme le solvant MFE sépare bien les monocaféoylquiniques (COLONNA, 1979). Ces substances pourraient être les deux monocaféoylquiniques (AC3Q et AC4Q).

L'acide diméthoxycinnamique a une $R_f=0,90$, est présent chez le *C. A315* et T5 (*Corticium sp*) ainsi que chez T10, T16 (*Helminthosporum sp*). L'acide *o*-coumarique, $R_f=0,95$, est présent chez *C. A315*, T1 (*Rhizoctonia sp*), T7 et T12 (*Verticillium*). La coumarine est présente seulement chez *C. sp A315* et T21 et T22 (*Penicillium*).

Un *Corticium sp* endophyte, produisant l'acide diméthoxycinnamique a été isolé parallèlement, chez les feuilles de *Coffea A305* par RATSIMBAZAFY, (2011).

Le spot fluorescent vert-jaune à 360 nm, invisible à 254 nm à $R_f=0,7$, est commun du genre *Helminthosporum* car il est observé sur les extraits de T10, T14 et T16 ainsi que chez *Corticium sp* (T5).

II-C-3-3 CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DES BACTERIES

Le chromatogramme des extraits hydroalcooliques bactériens est observé sous UV, à la longueur d'onde 254 nm (fig. 27A) et à 360 nm (fig. 27B), page 58.

Les spots de ces profils chromatographiques reflètent des substances qui migrent faiblement (substances polaires), dans le solvant MFE. Car les références frontales plus élevée est de $R_f = 0,61$.

Due à l'absence des substances de référence, nous ne pouvons pas identifier tous les métabolites secondaires des bactéries du chromatogramme.

Seule la substance à $R_f=0,25$, à fluorescence grise à 254 nm et bleu clair à 360 nm, pourrait être un monocaféoylquinique (AC3Q ou AC4Q). Cette substance a été identifiée à la fois chez les bactéries B1 et B6 ainsi que chez les feuilles de *C. A315*.

La substance qui a une $R_f = 0,61$, se trouve dans tous les extraits bactériens. Elle est de couleur gris à 254 nm et bleu clair à 360 nm.

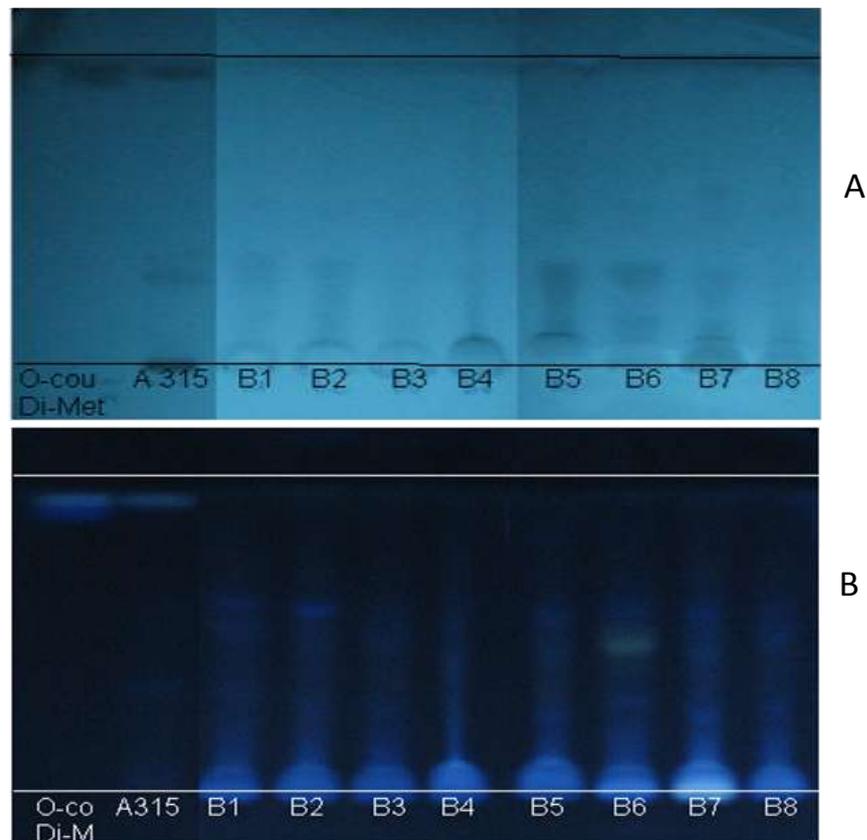


Figure 28: Chromatogrammes des extraits de bactéries endophytes de *C. A315* à 254 nm (A) et à 360 nm (B)

Nous avons constaté que le solvant MFE (Méthylisobutylcétone-acide formique-eau) ne sépare pas bien les extraits hydroalcooliques des bactéries. Les substances qui ont de fluorescence bleu clair à 360 nm sont trop apolaires. Elles migrent faiblement dans ce solvant, $R_f = 0,01$.

CONCLUSIONS

II-D CONCLUSIONS

Pour la première fois, les endophytes ont été étudiés sur les feuilles des *Mascarocoffea*.

L'isolement des microorganismes endophytes nécessite, non seulement, des équipements adéquats mais aussi une parfaite maîtrise des manipulations microbiologiques. Les contaminations sont à éviter depuis le prélèvement de l'explant à étudier jusqu'à la conservation des souches. Dans notre cas, l'explant provient d'une pépinière en serre contrôlée. Une plantule issue de semences de *C. A315* a été choisie et jugée apparemment saine. La vérification de présence de contaminants (durant la manipulation dès le prélèvement des feuilles jusqu'à la mise en culture) est la plus sévère. Dans ce mémoire, seul l'isolement des bactéries et champignons aérobies a été réalisé vu le nombre élevé des types à isoler. Néanmoins, l'isolement au maximum des populations endophytes des feuilles a été fructueux.

L'identification des bactéries n'a pu être totale car on les a beaucoup isolés. Cependant, l'utilisation de méthodes simples nous a permis de regrouper, 17 bactéries et 40 champignons, respectivement en 8 et 21 types. Chez *C. A315* le taux de colonisation des endophytes bactériennes est de 22,7%. Or, ce taux atteint jusqu'à 53,33% pour la population des champignons endophytes. Les champignons colonisent probablement mieux les feuilles de *C. A315* que les bactéries.

A titre de comparaison, des études sur *Centella asiatica* ont révélé un taux de colonisation qui peut atteindre jusqu'à 78% (RANDRIAMAMPIONONA, 2010). En outre, les palmiers en Bornéo et en Australie atteignent jusqu'à 81 à 89% (FRÖHLICH et al. 2000). En revanche, un faible taux de colonisation (21 à 30%) chez *Euterpe oleracea*, un palmier du Brésil (RODRIGUES, 1994) a été enregistré. Comparé à ces études antérieures, les champignons endophytes de feuilles de *C. sp A315* ont un taux de colonisation moyenne.

La fermentation joue un rôle très important dans la production des métabolites secondaires des microorganismes. L'extraction de ceux des bactéries est la plus délicate car elle demande un suivi de la cinétique de croissance (à petite échelle d'abord) (BUCHANAN 1918) dans une condition aseptique. Pour ce faire, nous avons adopté la culture statique (contrairement à l'infiniment mélangé), en discontinue avec des répétitions. La fermentation

est stoppée au début de la phase stationnaire pour chaque colonie bactérienne tandis qu'elle dure 8 semaines pour les champignons.

L'extraction proprement dite des métabolites secondaires des endophytes nécessite une destruction de la cellule productrice. Le broyage et le passage à l'ultrason semblent plus efficaces pour les extraire de la cellule hôte. Bien que la production de ces métabolites soit faible (de l'ordre de 2 mg/L), la chromatographie sur couche mince (CCM) les a détectés. Une trentaine de ces substances des microorganismes endophytes sont observés en CCM. Seulement, cinq d'entre eux sont identifiés faute de standard, des réactifs pour la révélation ainsi que des appareils de criblage chimique tels que HPLC, CPG, spectrophotomètre à balayage et spectre de masse.

L'isolement des microorganismes endophytes paraît être une clef pour les études des diversités biochimiques d'une plante donnée. Les huit bactéries endophytes isolées, les champignons T1 (*Rhizoctonia sp*) et T7 (*Verticillium sp*) semblent être responsables de la production des monocafoylquiniques (AC3Q et AC4Q), dans *C. sp A315*. Les champignons des feuilles, T5 (*Corticium sp*), T10 et T16 (*Helminthosporum sp*), seraient pour l'acide diméthoxycinnamique et l'acide *o*-coumarique, composés phénoliques dites rares dans le règne végétal, trouvés aussi en grande quantité dans les graines de ce taxon (RAKOTOMALALA, 1992). La coumarine serait la cinquième substance des feuilles de *C. A315* synthétisée par T21 et 22 (*Penicillium sp*). Malheureusement, le mélilotoside n'a pas été détecté chez les microorganismes endophytes.

Des nouvelles molécules pourraient se trouver (Li et *al.*, 2001) parmi les substances dont on ne possède pas les standards. Il faudra donc mener, encore, une investigation plus loin sur ces métabolites secondaires d'origine endophytes d'autant pour ceux des feuilles.

Ces endophytes, présents dans les différentes parties de la plante, peuvent se présenter comme, pathogènes bénins, saprotrophes dans les tissus ou, microorganismes mutualistes. Il faudra donc conduire d'autres études détaillées sur l'interaction de taxons d'endophytes bien identifiés avec des plantes hôtes, pour élucider la base fonctionnelle de ces symbioses.

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

II-E CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce mémoire est d'approfondir nos connaissances sur les substances naturelles majeures des feuilles de cinq populations de caféiers sauvages ou *Mascarocoffea*: *C. sp A315*, *C. sp 311*, *Coffea andrambovatensis A227*, le deux *Coffea ankaranensis A525* et *A808* et en comparaison avec deux espèces de caféiers cultivés *Coffea arabica* et *C. canephora*. Le témoin *Melilotus officinalis* a été utilisé pour sa richesse en mélilotoside (WICHTL et ANTON, 2003). Des comparaisons, sur les métabolites secondaires extraits de feuille de *C. sp A315*, et les métabolites secondaires de leurs microorganismes endophytes (RAJAONARIVELO, 2006) ont été abordées.

Pour atteindre ces objectifs, ces substances ont été extraites à partir des feuilles puis identifiées, en partie, par chromatographie sur couche mince (CCM). D'un autre côté, nous avons isolé les microorganismes endophytes des feuilles de *C. A315*. Après la fermentation, les métabolites secondaires de ces endophytes sont produits. Ces substances sont ôtées de leurs cellules productrices en utilisant la méthode d'extraction faite sur les feuilles.

Nos résultats ont montré que les feuilles de caféier contiennent diverses substances communes et particulières. La « trigonelline » se trouve dans tous les extraits aqueux de feuilles sauf chez le témoin *Melilotus officinalis*. « L'acide 5-caféoylquinique » est présent chez les témoins et à l'état de traces chez *C. A315*, *C. A311* et *C. A808*. De même la caféine n'est présente que chez *C. arabica* et *C. canephora* témoins.

En effet, la substance se trouvant en grande quantité chez le témoin Mélilot, d'une part, est caractéristique de groupe de *C. sp A315* (excepté *C. A808*). D'autre part elle pourrait être le mélilotoside ou acide β -glycosyl-oxy-cinnamique, RAKOTOMALALA (1992).

Les *C. A315* et *C. A311* se singularisent par la présence en commun d'autres substances telles que l'acide *o*-coumarique en forte quantité ainsi que la coumarine. *C. A311*, *C. A227* et *C. arabica* contiennent en particulier l'acide diméthoxycinnamique. Tandis que le monocaféoylquinique, un alcaloïde dérivé de la caféine, les fractions isochlorogéniques, non cristallisables (COLONNA, 1979) (dicaféoylquinique) sont caractéristiques de deux *Coffea ankaranensis* (*C. A808* et *C A525*). L'acide férulique ainsi qu'une substance qui pourrait être un dérivé de la caféine (méthylxanthine) ou un diterpène glycosidique (selon notre communication personnelle avec RAKOTOMALALA en 2011) ont été identifiés particulièrement chez *C. A525*. En comparaison avec les études qui ont été faites sur les

graines des *Mascarocoffea* (RAKOTOMALALA, 1992 ; RALALAMORIA, 1999 et RAKOTONDRAVAO, 2001), les feuilles semblent être des bons matériels d'études. Elles contiennent beaucoup plus de métabolites secondaires intermédiaires (organe de biosynthèse).

Nos résultats démontrent aussi que parmi les endophytes isolés, l'ensemble des huit bactéries, les champignons T1 (*Rhizoctonia sp*) et T7 (*Verticillium sp*) semble être responsables de la production des monocaféoylquiniques (AC3Q et AC4Q), dans le *C. A315*. Tandis que les champignons T5 (*Corticium sp*), T10 et T16 (*Helminthosporium sp*) seraient celui de l'acide diméthoxycinnamique et de l'acide *o*-coumarique, composés phénoliques rares (RAKOTOMALALA, 1992). La coumarine est la cinquième substance de feuille de *C. A315* via endophytes, qui serait produite par T21 et T22 (*Penicillium sp*).

Plusieurs autres composés que nous n'avons malheureusement pas pu identifier jouent certainement un rôle important pour la plante, pour ne citer que la résistance manifeste de A315 et des *Mascarocoffea* en général aux parasites communs des caféiers comme la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*), ou les insectes nuisibles comme le tigre du caféier (*Dulinius unicolor*) et les borers de tiges et de graines.

La diversité biochimique de ses caféiers sauvages pourrait provenir des associations diverses avec leurs habitats naturels, par exemple, la relation entre endophytes et métabolites secondaires d'un taxon, établi dans ce travail. En outre, certains acides chlorogéniques seraient codés par un ou des gène(s) majeur(s) avec allèle dominant car la teneur en ces composés varie considérablement d'une espèce à l'autre (CLIFFORD et *al.*, 1989, ANTHONY et *al.*, 1993 ; RAKOTOMALALA et *al.*, 1993). Certes, l'expression des gènes pourrait être reliée au facteur environnement qui intervient de façon non négligeable, entraînant même une sélection locale de ces caféiers.

Les perspectives sont ouvertes vers l'identification et valorisation de ces composés des feuilles et des endophytes des feuilles des *Mascarocoffea*. Des activités en tant que principes actifs, leurs utilisations dans des autres disciplines (médecine, agricultures, agroalimentaires...etc), sont aussi à prendre en considération. Il faudra conduire d'autres études détaillées sur l'interaction de taxons d'endophytes bien identifiés avec ses plantes hôtes, pour élucider la base fonctionnelle de l'interaction des plantes-endophytes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKIYAMA K., MATSUZAKI K., HAYASHI H., (2005): *Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi.* Nature, 435:824-827.
- ANDERSON J. W., (1968): *Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues.* Phytochem. 7: 1973-1988.
- ANDRADE P. B., LEITAO R., SEABRA R. M., OLIVEIRA M. B., FERREIRA M. A., (1998): *3,4-Dimethoxycinnamic acids levels as a tools for differentiation of Coffea canaphora var Robusta and Coffea arabica.* Food chemistry; 61: 511-514
- ANTHONY F., NOIROT M. & CLIFFORD M. N., (1993): *Biochemical diversity in the genus Coffea L.: chlorogenic acids, caffeine, and mozambioside contents.* Genetic Resources and Crop Evolution, 40, 61-70
- ARNOLD A. E., MAYNARD Z. & GILBERT G. S., (2001): *Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity.* Mycol Res. 105: 150p
- ARNOLD A. E., MEJIA L. C., KYLLO D., ROJAS E. I., MAYNARD Z., ROBBINS N., HERRE E. A. (2003). *Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree.* Proc Natl Acad Sci USA, 100:15649-15654
- BACON C. W. & WHITE J. F., (2000): *Microbial endophytes.* Marcel Dekker Inc. New York, 101:106p.
- BARNES M. H., FELDMAN J. R. et WHITE W., (1950): *Isochlorogenic acid, Isolation from coffee and structure studies.* J. Am. Chem. Soc 22: 4178-4182.
- BRIDSON D., (1994): *Additional notes on Coffea (Rubiaceae) from tropical east Africa.* Kew Bulletin, 49: 331-341.
- BROWN, S. A. et A. M. ZOBEL, (1990): *Biosynthesis and distribution of coumarines in the plant.* Journal of Chemical Ecology, 16(3): 693-700.
- BRUNETON, J., (2009): *Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales*, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc Éditions médicales internationales, Paris, 1288p
- BUCHANAN R. E., (1918): *Life phases in a bacterial culture.* J. Infect. Dis. 98:1271-1273.
- CAMPA C., BALLESTER J. F., DOULBEAU S., DUSSERT S., HAMON S., NOIROT M. (2004): *Trigonelline and sucrose diversity in wild Coffea species* Food Chemistry. 88:39-43
- CASLEY-SMITH J. R., (1993): *Treatment of lymphoedema of arms and legs with 5,6-benzo-alpha-pyrone.* The new England journal of medicine, vol. 329, no 16.
- CASLEY-SMITH J. R., (1999): *Benzo-pyrones in the treatment of lymphoedema.* International angiology, 18(1): 31-41
- CHALLIS B. C., BARTLETT C. D., (1975): *Possible cocarcinogenic effects of coffee constituents.* Nature 254: 532-533.
- CHARRIER A. et BERTRAUD J., (1975): *Variation de la teneur en caféine dans le genre Coffea ;* Café Cacao Thé, vol. XIX, n° 4. 251-254
- CHARRIER A., (1978): *La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (Mascarocoffea). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea).* Mémoires ORSTOM, Paris, 87, 223 p.
- CHEVALIER A., (1938): *Essai d'un groupement systématique des caféiers sauvages de Madagascar et des Iles Mascareignes.* Rev. Bot. Appl. et Agr. Trop., 11: 825-843.

- CHEVALIER A., (1942): *Les caféiers du globe, fasc. II. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés, et des Rubiacées sauvages prises pour des cafés.* In: P Lechevallier (ed), Encyclo biol, Tome XXII, Paris 158p.
- CHEVALIER A., (1947): *Les caféiers du globe. III: Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles.* Encycl. Biol., P. Lechevallier, Paris, 356p
- CLAY K., (1990): *Fungal endophytes of grasses.* Annu Rev Ecol Systemat 21:275–297
- CLAY K., SCHARDL C., (2002): *Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses.* Am Natural 160:S99–S127
- CLIFFORD M. N., (1985): *Chlorogenic acids.in Coffee I. Chemistry.* London: Elsevier Applied Science Publisher. 1985a; Vol. 1, Chapter 5.
- CLIFFORD M. N., WILLIAMS T., BRIDSON T., (1989): *Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in Coffea and Psilanthus.* Phytochemistry, 28: 829-838.
- CLIFFORD M. N., GIBSON G. L., RAKOTOMALALA J. J. R., CROS E. et CHARRIER A., (1991): "Caffeine from green beans of *Mascarocoffea*." Phytochemistry 302: 4039-4040.
- CLIFFORD, M. N., (1999): *Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 362–372,
- CLIFFORD, M. N., (2003): *Methods in Polyphenol Analysis* », chap 14. *The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates*, Editeur : C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.), pour la Royal Society of Chemistry, Cambridge, 314-337
- COLDITZ F., BRAUN H. P., JACQUET C., NIEHAUS K., KRAJINSKI F., (2005): *Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased Aphanomyces euteiches-tolerance of Medicago truncatula.* Plant Mol Biol, 59:387-406.
- COLONNA J. P., (1968): *L'acide chlorogénique chez les végétaux ; cas du caféier.* Rapp. de DEA, Toulouse, 1968, 35p
- COLONNA J. P., (1979): *L'acide chlorogénique et les depsides de divers caféiers africains et malgaches : leur participation au métabolisme et leur signification biologique.* Travaux et Documents de l'ORSTOM, N°102,210p.
- CORSE J., LUNDIN R. E. & WAISS A. C., (1965): *Identification of several components of isochlorogenic acid* Phytochem. 21: 527-529.
- DAVIS A. P., R. GOVAERTS, D. M. BRIDSON & P. STOFFELEN., (2006): *An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae).* Bot. J. Linnean Soc.152: 465-512.
- DECKERT R. J., MELVILLE L & PETERSON R. L., (2001): *Structural features of a Lophoderminium endophytes during the cryptic life-cycle in the foliage of Pinus strobes.* Mycol Res.105: 991-997
- FARAH A., DONANGELO C. M., (2006): *Phenolic compounds in coffee.* Braz. J. Plant Physiol., 18 (1): 23-36.
- FISCHER H. O. L. & DANGSCHAT G., (1932): *Konstitution der chlorogensaure.* Ber. Deut. Chem. Ges., 65 B, 1037-1040
- FISHER D.J., (1965 – 1966): *Phenolic compounds of the apple fruit cuticle.* A.R. Long Ashton Agric. Hort. Res. Stat., 255-258.
- FLEURIET A., MACHEIX J. J., (1981): *Quinyl esters and glucose derivatives of hydroxycinnamic acids during growth and ripening of tomato fruit.* Phytochemistry, 20:667-672.

- FREUDENBERG K., (1920): *Heber gerbstoffe. III. Chlorogensaure der Gerbstoffartige Bestandteil der Koffeebohnen.* ber, 53: 241-243.
- FRÖHLICH J., HYDE K. D. & PETRINI O. (2000): *Endophytic fungi associated with palms.* Mycol. Res. 104: 1202-1212.
- HANSON K. R. & ZUCKER M., (1963): *The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. Chromatographic separation and characterization.* J. Biol. Chem., 238 (3):1105-1115.
- HARRISON M. J., (2005): *Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.* Annu Rev Microbiol, 59:19-42.
- HOFFMANN L., (2003): *Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3- O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinat hydroxycinnamoyl Transférase (HCT).* Thèse de Doct.(IBMP-CNRS), Strasbourg ; 272p
- HOFMANN L., (1790): *Crell's chemische* Annal., II, S. 314, cité dans Baup: Annalen der Physik und Chemie 1833, S. 64
- HANS G. S., (1990): *Général microbiology.* Cabridge University Press, 6th ed: 338-339
- HONG L., WEN X. Z., JUN C. M., JUN H., REN X. T., (2000) *New bioactive metabolites produced by Colletotrichum sp, an endophytic fungus in Artemisia annua* Plant sciences., 151 (1): 67-73
- GARBEVA P., OVERBEEK L.S., VUURDE J.W., ELSAS J.D., (2001): *Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments.* Microbil. Ecol. 41: 369p
- GAUCHER L., (1895): *De la caféine et de l'acide cafétanique dans le caféier. Recherches microchimiques.* Thèse pharm. Montpellier, 255p
- GENRE A, CHABAUD M, TIMMERS T, BONFANTE P, BARKER DG: (2005): *Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in Medicago truncatula root epidermal cells before infection.* Plant Cell, 17:3489-3499.
- IYAMA K.; LAM T. B.-L., STONE B. A., (1994): *Covalent Cross-Links in the Cell Wall.* Plant Physiology, vol 104: 315-320.
- IWAHASHI H., ISHII T., SUGATA R., KIDO R., (1990): *The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride, and hydrogen peroxide.* Arch Biochem Biophys 276: 242-247.
- JEAN J. et REID W. W., (1959): *Chlorogenic acids of tobacco.* Chem. Indus., 1959, 655-656.
- JOHNSON N. C., GRAHAM J. H., SMITH F. A., (1997): *Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum*”. New Phytol, 135:575-585
- KARL-HEINZ K., PHILIPP F. & RALPH H., (2006): *endophytes or parasites-what decide?* Elsevier, 9:358-363
- KY C.L., (2000): *Déterminisme génétique de quelques composés biochimiques de la graine de café vert impliqués dans la qualité à la tasse. Etude d'un croisement interspécifique entre Coffea pseudozanguebariae et C. liberica var. dewevrei.* Thèse Doct., ENSAM, Montpellier, 157 p.
- KY C. L., GUYOT B., LOUARN J., HAMON S., NOIROT M., (2001): *Trigonelline inheritance in the interspecific Coffea pseudozanguebariae x C. liberica var. dewevrei crosses.* Theor Appl Genet; 102:630-634
- LARPENT J. P. et LARPENT-GOURGAUD M. (1997). *Mémento technique de microbiologie : Métabolites primaires. Chapitre 7; 1037p.*

- LELOUP V., LOUVRIER A., & LIARDON R. (1995): *Degradation mechanisms of chlorogenic acids during roasting.* Proceedings of the International Congress of ASIC, 16: 192–198.
- LE PIERRES D. (1995) : *Etude des hybrides interspécifiques tétraploïdes de première génération entre Coffea arabica L. et les caféiers diploïdes.* Thèse Doctorale, Université Paris XI (Orsay), 278 p
- LI J. Y., HARPER J. K., GRANT D. M., TOMBE B. O., BASHYAL B., HESS W. M. & STROBEL G. A., (2001): *Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from Pestalotiopsis spp. and Monochaetia sp* Phytochemistry 56: 463-468.
- LOUARN J. (1972): *Introduction à l'étude génétique de Mascarocoffea : nouvelle détermination de leurs nombres chromosomiques.* Café Cacao Thé, vol. XV, no 4
- MACHEIX J. J., (1974): *Les esters hydroxycinnamiques de la pomme ; identification, variations au cours de la croissance du fruit et métabolisme.* Thèse Doct. Et.Sci., Paris, 6 (1974), 168 p.
- MACHEIX J. J., FLEURIET A., BILLOT J. (1990): *Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits.* In: Fruit Phenolics, CRC Press, Inc Boca Raton, FL,149-237
- MARCHAL N., BORDON J. L., RICHARD D., (1991): *Les milieux de cultures pour l'isolement et identification biochimique des bactéries.* Biologie appliquée, nouvelle édition, Paris: 31-347
- MATERN U., STRASSER H., WENDORFF H. & HAMERSKI D. (1988): *Coumarins and furanocoumarins.* Cell culture and somatic cell genetics of plants, Academic Press: 3-20.
- MONDOLOT L., PHILIPPE L. F., BRUNO B., TALANSIER E., DE KOCHKO A. and CAMPA C., (2006): *Evolution in Caffeoylquinic Acid Content and Histolocalization During Coffea canephora Leaf Development.* Annals of Botany; 98: 33–40,
- MORISHITA H., IWAHASHI H., & KIDO R., (1989) *3-O-caffeoyl-4-Oferuloylquinic acid from green Robusta coffee beans.* Phytochemistry, 25: 2679–2680.
- MÜLLER C. B., KRAUSS J., (2005): *Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes.* Curr Opin Plant Biol, 8:450-456
- MURRAY R. D. H., MENDEZ J. and BROWN S. A., (1982): *The natural coumarins: occurrence chemistry and biochemistry.* ed J Wiley and Sons Chichester U K 1982
- NIGGEWEG R., MICHAEL A J., MARTIN C., (2004): *Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid.* Nat Biotechnol. 22: 746-54.
- OBERMEYER W. R., MUSSER S. M., BETZ J. M., CASEY R. E., POHLAND A. E., (1995): *Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and CGA.* Page SW PSEBM 208: 6–12.
- OLTHOF M. R., HOLLMAN P. C., KATAN M. B., (2001): *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans.* dans J. Nutr., vol. 131, no 1, 66–71
- ONE (2006) : *profil environnemental : région Vatovavy Fitovinany* . 61p
- PAGANGA G., MILLER N., RICE-EVANS C. A., (1999): *The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities what does a serving constitute?* Free Radic Res 30: 153–162,
- PAYEN A., (1846): *Premier mémoire sur le café.* C. R. Acad. Sci, 22, 724-737.
- PETRINI O., STONE J., CARROLL F. E., (1982): *Endopytic fungi in evergreen strubs in western Orego: Apréliminary study.* Can. J. Boot. 60: 786-796

- PETRINI O., (1991): *fungal endophytes of tree leaves* in ANDREWS JH, HIRANNO SS (Eds) *Microbial ecology of leaves*. **Springer Verlag**, New York, pp 179-187
- PLESCA-MANEA L., (2002): *Effects of Melilotus officinalis on acute inflammation*. **Phytotherapy research**, 16: 316-9.
- PORTER J. K., BACON C. W.; ROBINS J. D., (1979): *Lysergic acid amide derivatives from Balansia epichloe and Balansia claviceps (Clavicipitacea)*. **J Nat Prod** 42: 309-314
- POULTON J. E., MCREE E. E., (1980). *Occurring of coumarin in Melilotus officinalis*. **Conn. J. Plant Physiol.**; 65: 171-175
- RAJAONARIVELO A. J. P., (2006): *Contribution à l'étude des activités antimicrobiennes des métabolites secondaires de dix champignons endophytes de Centella asiatica (Apiaceae)*. **Mémoire de DEA, Option Biochimie**. Université d'Antananarivo. 78p
- RAKOTOMALALA J. J. (1992): *Diversité biochimique des caféiers: Analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosidiques. Particularités des caféiers de la région malgache (Mascarocoffea Chev.)*. **Thèse de l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier**, 187p.
- RAKOTOMALALA J. J. R., CROS E., CHARRIER A., ANTHONY F., NOIROT M. (1993): *Marqueur biochimique de la diversité des caféiers*. **Paris : ASIC**, 47-55.
- RAKOTONDRAVAO A. (2001): *Etudes des diversités biochimiques des grains de quelques Mascarocoffea Chev*. **Mémoire de DEA de Biochimie Université d'Antananarivo**. 73p
- RALALAMORIA L. (1999): *Etude des activités allélopathiques des acides phénols, des bases puriques et des diterpènes glycosidiques extraits des graines de Coffea canephora, et de deux Mascarocoffea : C. A150 et C. sp A311* **Mémoire de DEA de Biochimie Université d'Antananarivo**. 77p
- RANDRIAMAMPIONONA D., (2010): *Conservation ex-situ des ressources phylogénétiques, cas des plantes médicinales à Madagascar*. **Thèse de doctorat de physiologie Végétale**. Université d'Antananarivo 213p
- RATSIMBAZAFY T. N. T. Z. A., (2011): *Relation entre spécificité chimique de Coffea perrieri population A305 et les endophytes de ces feuilles*. **Mémoire de DEA de Biochimie, Université d'Antananarivo**. 70p
- REDLIN S.C., CARRIS L. M., (1996): *Endophytic fungi Grasses and Woody plants: systematics, ecology and evolution*, **APS Press, St. Paul** (Minnesota), USA ; 223p
- REDMAN R. S., SHEEHAN K. B., STOUT R. G., RODRIGUEZ R. J., HENSON J. M., (2002): *Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis* **Science**, 298:1581p
- ROBIQUET et BOUTRON, (1837): *Sur le Café*. **Journal de Pharm.**, 22: 93-108.
- ROCHLEDER F., (1844): *Untersuchungder Kaffeebohnen*. **Ann der. Chem. und. Pharm.**, 50: 221-231
- RODRIGUES K. F. (1994). *The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm Euterpe oleracea*. **Mycologia** 86: 376-385.
- RODRIGUES K. F., DRANDAROV K., HEERKLOTZ (2001): *Guignardric acid, a novel type of secondary metabolite produced by endophytic fungi Guignardia sp: isolaton, structure elucidation and asymmetric synthesis*. **Helv Chim Acta** 84: 3766-3772
- SCARPATI M. L. & GUISSO M., (1963): *Acidi caffeil-chimico del caffee del mate* **Ann. Chim. Rome**, 53 (10) 1315-1328.

- SCARPATI M. L. & GUISSO M., (1964): Structure of the three dicaffeoyl-quinic acids of coffee. *Tetrahedron letters*, 39-40: 2851-2853.
- SINCLAIR J. B. & CERKAUSKAS R. F., (1996): Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In REDLIN S. C. and CARRIS L. M., (1996): *Endophytic fungi in grasses and woody plants: Systematics*. *Ecology, and Evolution*. APS PRESS: 3-29.
- SLOTTA K. H., et NEISSER K., (1939): Chemistry of coffee. V. Recent analytical finding. *Ber. Det. Chem. Ges.*, 22: 126-133.
- SONDHEIMER E., (1964): Chlorogenic acid and related depsides. *Bot. Rev.*30: 667-711.
- STONE J. K., BACON C. W., WHITE J. F., (2000): An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: *Bacon CW, White JF (eds) Microbial endophytes*. *Marcel Dekker, Inc., New York*, New York, pp 3-30
- STURZ A. V., CHRISTIE B. R., NOWAK J., (2000): Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production, *Crit. Rev. Plant Sci*. 19:1-30.
- SCHULZ B., BOYLE C., (2005): The endophytic continuum. *Mycol Res*, 109:661-686.
- TANGUY J., (1970): Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac souche commune*. Thèse *Doct. Et. Sci.*, Paris, 136 p.
- WALLER F, ACHATZ B, BALTRUSCHAT H, FODOR J, BECKER K, FISCHER M, HEIER T, HU CKELHOVEN R, NEUMANN C, VON WETTSTEIN D et al. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci; USA*, 102:13386-13391.
- WEIDNER S., ARNOLD W., STACKEBRANDT E., (2000): A. Puhler, Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with the leaves of the seegrass *Halophila stipulacea* by a cultureindependent small-subunit rRNA gene approach, *Microbiol. Ecol*. 39: 22-31.
- WELINGTON L. A., WALTER M. J. R., CARLOS I. A-V., PAULO B., HALHA O. S., & JOÃO L. A. (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of *Citrus rootstocks*. *Can. J. Microbiol*. 47(3): 229-236
- WEST C. P., (1994): Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. In *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, *Bacon C. W. and WHITE J. F. Jr. (Eds). CRC. Press Boca Raton*. Pp 87-99
- WILSON C.L., (1977): Management of beneficial plant diseases, in: J.G. Horsfall, T. Cowling (Eds.), *Plant diseases: an advanced treatise*, *Academic Press*, New York, Pp. 347-362.
- WICHTL M., ANTON R., (2003): *Plantes thérapeutiques-Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. *TEC & DOC, Paris*, 16: 379-381
- YANG L., HAOFENG H., NORIO N., MASAO H., ZHENGTAO W.& LUOSHAN X. (2007) Bio-guided Isolation of antioxidants from the Stems of *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* *Phytother. Res*. 21: 696-698
- ZENG XIN-QIANG, NAGAI C., ASHIHARA H., (2004): Pyridine nucleotide cycle and trigonelline (N-methylnicotinic acid) synthesis in developing leaves and fruits of *Coffea Arabica*. *Physiol. Plant*. 122: 404-411.

WEBOGRAPHIE: [Http://www.croupwhacth.org](http://www.croupwhacth.org)

Liste de communication personnelle: - Docteur RAKOTOMALALA JEAN JACQUES R. (2011)

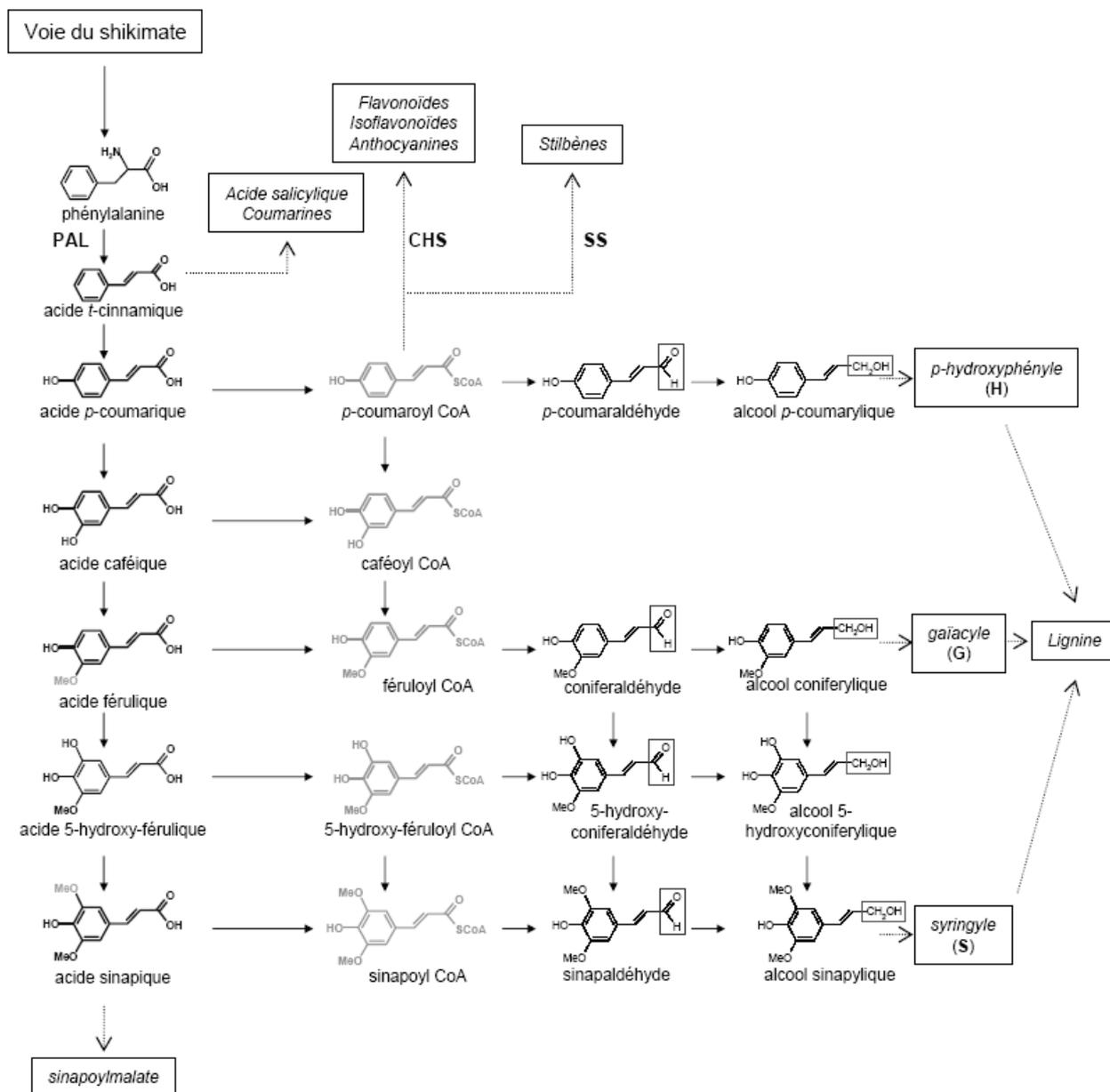
- Professeur CLAUDINE CAMPA (2011)

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE I:

METABOLISME DES PHENYLPROPANOÏDES



Représentation simplifiée du métabolisme des phénylpropanoïdes. Les principaux intermédiaires métaboliques sont présentés; les étapes enzymatiques seront décrites ultérieurement.

Le premier composé phénylpropane est l'acide *t*-cinnamique. Il va conduire à cinq autres acides hydroxycinnamiques (en bleu) qui diffèrent par leur degré d'hydroxylation (rouge) et de méthylation (vert). Les esters de CoA correspondants (en orange) représentent les intermédiaires activés du métabolisme des phénylpropanoïdes. Les fonctions carboxyles estérifiées peuvent subir deux étapes de réduction conduisant successivement aux fonctions aldéhydes (□) puis alcools (□). Trois de ces composés alcools constituent des précurseurs de la lignine, les unités *p*-hydroxyphényle (H), gallocatechol (G) et syringyle (S).

PAL, phénylalanine ammoniac lyase; CHS, chalcone synthase; SS, stilbène synthase.

ANNEXE II LES REACTIFS DE CARREZ

Le réactif de Carrez comprend 2 solutions dont la solution A et la solution B

La solution A est obtenue en dissolvant 21,9 g d'acétate de zinc dihydrate dans de l'eau contenant 3 g d'acide acétique glacial; on complète ensuite à 100 ml par de l'eau distillée.

La solution B est préparée en dissolvant 10,6 g de ferrocyanure de potassium trihydrate dans 100 ml d'eau distillée

ANNEXES III: REACTIFS DE LA COLORATION DE GRAM**a) Solution de Hucker**

Solution A	-Crystal violet	2,0g
	-Ethanol 96°	20g
Solution B	-Oxalate d'ammonium 1%	0,8g
	-Eau déminéralisée	80ml

Le Crystal violet est laissé en contact 3 jours dans l'éthanol absolu. Mélanger les solutions A et B. Stocker 24 heures avant l'utilisation. Filtrer sur papier wattmans et conserver dans une bouteille de stockage.

b) Solution du lugol de gram modifié

- Iode	1g
- KI	2g
- Eau déminéralisé	300ml

Dissoudre l'iode pendant une nuit dans un lieu sombre. On écrase l'iode sèche et le KI dans un mortier jusqu'à ce qu'ils soient en solution. L'eau est ajoutée progressivement. On place la solution obtenue dans une bouteille sombre et les eaux de lavage sont récupérées par rinçage.

c) Décolorant

Solution d'acétone-éthanol v/v

d) Contre colorant

Solution de stock :	- Safranine O	2,5g	
	- Ethanol absolu		100ml

Solution de travail :	- Solution de stock :	10ml
	- Eau déminéralisé	90ml

Les réactifs de la coloration de Gram doivent être frais ou conservés moins de 1 an, en général

ANNEXE IV: LES MILIEUX DE CULTURES**Dextrose Yeast Peptone Agar (DYPA)**

Glucose.....	40g
Yeast extract.....	5g
Peptone.....	10g
Agar.....	20g
Eau distillée, qsp.....	1000ml

pH=5,5 à 5,6

Oatmeal Agar (OA)

Grain de l'avoine.....	10g
Agar.....	15
Eau distillée, qsp.....	1000ml

pH=5,5 à 5,6

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre.....	200g
Dextrose.....	40g
Agar.....	15
Eau distillée, qsp.....	1000ml

pH=5,5 à 5,6

Potato Dextrose Broth (PDB)

Pomme de terre.....	200g
Dextrose.....	40
Eau distillée, qsp.....	1000ml

pH=5,5 à 5,6

Hajna Kligler

Peptone.....	2g
NaCl.....	5g
KH ₂ P ₀₄	0,3g
Bleu de bromocrésol.....	0,003g
Agar.....	3g
Eau distillée, qsp.....	1000ml

pH=7,1 à 7,4

Nutrient Agar (NA)

Extrait de viande.....	15g
Peptone.....	10g
NaCl.....	5g
Agar.....	20g
Eau distillée, qsp.....	1000ml

pH= 7,3 à 7,4

ANNEXE V: IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS

Rhizoctonia sp: c'est un champignon asexué, c'est-à-dire les mycéliums sont constitués uniquement d'hyphes (spores absentes). Il possède des sclérotés bruns ou noirs de formes variables, fréquemment petits reliés par des fils de mycélium. Les hyphes sont bruns, avec des longues cellules septées et forment l'ensemble de branche des hyphes principaux. Ils sont souvent parasites, principalement des racines ou d'autres parties des organes souterraines.

Verticillium sp: les conidiophores minces sont embranchés. Les branches sont verticillées (en spirales) ; les conidies sont ovoïdes. Les conidies sont diaphanes (transparentes), unicellulaires et soutenues séparément ou en amas dans de petits faisceaux apicaux. Les *verticillium sp* causent souvent la fané de quelques plantes (parasites vasculaires), parasites d'autres mycètes mais la plupart sont des saprophytes.

Cladosporium sp: les conidiophores sont embranchés différemment près de la portion supérieure ou centrale, groupés ou en morceau des cloisons séparés. La conidie est sombre, unicellulaire ou en deux cellules. La conidie a de forme variable, allant de la forme ovoïde à cylindrique, souvent irrégulière. On peut souvent observer quelques parties des hyphes, sous forme de citron. C'est un parasite de nombreuses plantes ou simplement saprophytes.

Colletotrichum sp: La colonie est sous forme de disque ou comme un coussin, cireux. On les trouve souvent sous l'épiderme. Elle est de couleur sombre et dentelée. Les conidiophores sont simples ou allongés. Les conidies sont transparentes, unicellulaires, ovoïdes ou oblongues. C'est un genre parasite ou saprophyte de nombreuses plantes. Ce genre diffère de *Gleosporium* en ayant des épines qui peuvent être absentes dans certaines conditions de culture.

Gliocladium: les conidiophores sont septés. Les parties supérieures soutenant les branches sont pénicillées. C'est-à-dire, formant une « brosse » compacte comme celle qu'on trouve chez les *Penicillium*. Les conidies sont diaphanes (transparentes) ou brillamment colorés dans la masse. Les conidies sont unicellulaires et produites successivement en apex, se rassemblant en gouttelettes mucilagineuses. Il est un saprophyte commun dans le sol. Le genre ressemble à un *Penicillium* excepté le matériel mucilagineux tenant les masses de spore.

Helminthosporium sp Le mycélium s'évolue de blanc à noire dans la culture. Les conidiophores s'étendent plus facilement, et sont courts ou longs. Ils sont septés ; simples ou embranchés. Ils sont plus ou moins irréguliers ou pliés, soutenant des conidies successivement sur la nouvelle alimentation. Les conidies sont sombres, contenant typiquement plus de 3 cellules. La forme de la conidie peut être soit cylindrique, soit en ellipse. Elles sont parfois incurvées ou pliées, avec de l'extrémité arrondie. Ils sont parasites de l'herbe, entraînant fréquemment les taches sur les feuilles des graminées.

Pillularia Berkh. Mycélium non étendu, les jeunes mycéliums sont transparents et devenant foncés avec l'âge (noirs et brillants dans des vieilles cultures), soutenant latéralement plusieurs conidies. Les conidies secondaires sont diaphanes ou foncées, unicellulaires, ovoïdes, produisant d'autres conidies par bourgeonnement. Ils sont saprophytes ou faiblement parasite qu'on les trouve souvent dans le sol. Leurs variantes ressemblent au candida.

Botrytis Pers, Il est souvent constitué des mycéliums gris, s'élevant rapidement dans la culture. Les conidiophores longs, minces sont souvent pigmentés, embranchés. Les cellules

apicales agrandies et arrondies soutiennent des faisceaux des conidies. Les conidies sont diaphanes (transparentes) ou de couleur de cendre (gris dans la masse). Les conidies sont unicellulaires, ovoïdes. Des sclérotés noirs et irréguliers sont fréquemment produits. C'est un Parasite, entraînant « les moisissures grise » de beaucoup de plantes, ou simplement saprophyte.

Penicillium. Les conidiophores résultants du mycélium sont groupés séparément dans le synnemata. Les conidiophores sont embranchés près de l'apex pour former une structure de balaye. L'ensemble de conidie s'enroule. La terminaison des phyalides pince les conidies sous forment des chaînes. Les conidies sont diaphanes ou brillamment colorées dans les masses, unicellulaires. Les conidies sont sphériques, et produites par la baside. Un grand nombre d'espèces sont parasites (produisant des putréfactions des pièces charnues), et saprophytiques.

Nom: ANDRIAMIALIHARISOA
Prénoms: Ravaka Fanoharantsoa
Titre: METABOLITES SECONDAIRES PARTICULIERS DES FEUILLES DE CINQ POPULATIONS DE MASCAROCOFFEA ET DES ENDOPHYTES DES FEUILLES DE *Coffea sp A 315*
Année : 2011
Nombre de page : 73

RESUME

Quelques métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de *Mascarocoffea* de la série *Multiflorae* (*C. sp A315*, *C. sp A311*, *C. andrambovatensis A227*) et *C. ankaranensis A525 et A808*) ont été étudiés. *Melilotus officinalis* ainsi que les deux caféiers cultivés (*C. arabica* et *C. canephora*) sont utilisés comme témoins. Les endophytes des feuilles de l'espèce *Coffea sp A315* ont été particulièrement analysés. Après l'isolement et la purification, on induit la production des métabolites secondaires des microorganismes endophytes par le procédé de la fermentation. L'extraction hydroalcoolique à froid a été utilisée sur les échantillons végétaux et sur les produits de fermentation d'origine endophyte. Les métabolites secondaires ont été analysés par le biais de la CCM qualitative en utilisant des substances de référence.

Nos résultats ont montré l'absence de la caféine, la présence de l'acide caféoyl-5-quinique à l'état de traces ainsi que de la trigonelline dans toutes les feuilles des cinq *Mascarocoffea*. Le mélilotoside, composé spécifique du témoin *M. officinalis* est trouvé dans les extraits des feuilles de toutes les populations étudiées à l'exception de A808. *Coffea sp A311* et *C. sp A315* se singularisent par la présence de l'acide *o*-coumarique et la coumarine. *C. sp A311*, *C. andrambovatensis A227* et *C. arabica* semble contenir en commun des dérivés d'acides diméthoxycinnamiques. En revanche, les acides monocaféoylquiniques (AC3Q et AC4Q), une méthylxanthine non identifiée, un ester de l'acide *o*-coumarique et certains dicaféoylquiniques sont caractéristiques de *C. ankaranensis A808* et *C. A525*. L'acide férulique ainsi qu'une substance inconnue (méthylxanthine ou diterpène glycosidique?) ont été aussi observé seulement chez *C. A525*.

Nos résultats démontrent aussi que parmi les microorganismes endophytes isolés des feuilles de *C. A315*, les huit bactéries, les champignons T1 (*Rhizoctonia sp*) et T7 (*Verticillium sp*) semblent être les responsables de la production des acides monocaféoylquiniques (AC3Q et AC4Q). Les champignons T5 (*Corticium sp*), T10 et T16 (*Helminthosporum*) sont les responsables de la production de l'acide *o*-coumarique, de dérivés de l'acide diméthoxycinnamique tandis que T21 et T22 (*Penicillium*) produisent la coumarine, composé toujours spécifique des feuilles de *C. sp A315*. Les métabolites secondaires particuliers de feuilles appartenant au « groupe de *C. A315* » peuvent être qualifiés comme une œuvre de leurs propres microorganismes endophytes.

Mots clef: *Mascarocoffea*, série *Multiflorae*, groupe de *C. sp A315*, métabolites secondaires, endophytes, mélilotoside, acides chlorogéniques, acide *o*-coumarique, diméthoxycinnamique.

Encadreur: RAKOTOMALALA Jean Jacques Rolland

Name: ANDRIAMIALIHARISOA
First name: Ravaka Fanoharantsoa
Title: PECULIAR SECONDARY METABOLITES OF LEAVES OF FIVE
MASCAROCOFFEA POPULATIONS AND THE LEAVES'
ENDOPHYTES OF *Coffea sp A315*
Number of page: 73
Year: 2011

ABSTRACT

Some secondary metabolites from leaves of five populations of *Mascarocoffea* belonging to the "series *Multiflorae*" (*C. sp A315*, *C. sp A311*, *C. andrambovatensis A227*, *C. ankaranensis A525 and A808*) were studied. *Melilotus officinalis*, *Coffea arabica* and *C. canephora* are used as plant controls. The leaves' endophytes of *Coffea sp A315* were specially analyzed. The production of secondary metabolites by the leaves' endophytes was induced by the fermentation process after their purification.

The secondary metabolites of leaf samples were analyzed by CCM from cold water-alcohol extracts, with the help of available chemical standards. Our results show the absence of caffeine and only trace of cafeoyl-5-quinic acid and trigonelline in the leaves of these coffee-trees. All leaves' extracts contain melilotoside, main compound of *Melilotus officinalis*, except those of *A808*. Coumarin and *o*-coumaric acid are peculiar compounds of *C. sp A311*, *C. sp A311*. *C. A311*, *C. A227* and *C. arabica* contain altogether dimethoxycinnamic acid derivatives. On the other hand, monocaffeoylquinic acids (3ACQ and 4ACQ), an unknown methylxanthine, other *o*-coumaric acid and dicaffeoylquinic acids derivatives are characteristic of *C. ankaranensis A808* and *A525*, will ferulic acid and another unknown compound (méthylxanthine or diterpènes derivative?) were found in the leaves' extract of *C. A525*only. Our results also show that among the isolated micro-organisms endophytes, the eight bacteria, the fungus T1 (*Rhizoctonia sp*) and T7 (*Verticillium sp*) seem in charge of production of monocaffeoylquinic acids (3ACQ and 4ACQ); the fungus T5 (*Corticium sp*), T10 and T16 (*Helminthosporum sp*) are in charge of the production of dimethoxycinnamic acid and *o*-coumaric acid derivative, while coumarin, another peculiar compound of the leaves of *C. sp A315* is synthesized by T21 and T22 (*Penicillium*). So, it appears that the endophytes are the main producers of compound found in the leaves' extract of the "*C. sp A315* group".

Key Words: *Mascarocoffea*, *Multiflorae*, *C. sp A315* group's, endophytes, secondary metabolites, mélilotoside, chlorogenic acid, *o*-coumaric acid, dimethoxycinnamic.

Supervisor: RAKOTOMALALA Jean Jacques Rolland
